

**REGULATION DES STOFFWECHSELS
DURCH ÄNDERUNGEN DES pH
UNTERSUCHUNGEN AN CHLOROPLASTEN**

Karl Werdan

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE
UND ZELLBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher - Prof. Dr. E.M. Klingenberg
Prof. Dr. F. Miller - Prof. Dr. H.G. Zachau

REGULATION DES STOFFWECHSELS DURCH ÄNDERUNGEN DES pH
UNTERSUCHUNGEN AN CHLOROPLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl Werdan

aus
Langerringen

Jahr
1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.W. Heldt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. M. Klingenberg
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.8.1975



INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG

II METHODISCHER TEIL

- a) Präparation der Chloroplasten und Inkubationsbedingungen
- b) Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation
- c) Messung der Carboanhydrase-Aktivität
- d) Messung der CO_2 -Fixierung und Phosphoglyzerat-Reduktion mit gleichzeitiger pH-Bestimmung
- e) CO_2 -Fixierung im Dunkeln

III pH - MESSUNG IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM INTAKTER SPINATCHLOROPLASTEN

- a) Prinzip
- b) pH-Messung in isolierten Chloroplasten
- c) Abschätzung des relativen Anteils des Stroma- und Thylakoidraumes am sorbitimpermeablen Chloroplastenraum
- d) Verlässlichkeit der Methode

IV LICHTINDUZIERTER pH - VERÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM ISOLIERTER CHLOROPLASTEN

- a) Kinetik der lichtinduzierten pH-Veränderungen im Stroma- und Thylakoidraum
- b) Beeinflussung des pH-Gradienten über die Thylakoidmembran durch die Lichtintensität und durch verschiedene Entkoppler
- c) Lichtinduzierter Protonentransport aus dem Stromaraum in das Medium
- d) Gezielte Beeinflussung des pH im Stroma
- e) Pufferkapazitäten des Stroma- und Thylakoidraumes
- f) Zusammenfassung der Eigenschaften von Substanzen zur pH-Bestimmung und pH-Variation

- V EINFLUSS DES pH-GRADIENTEN ÜBER DIE INNENMEMBRAN
AUF DIE METABOLITAUFNAHME IN CHLOROPLASTEN
- a) Transport von Metaboliten, die über den Phosphat-carrier aufgenommen werden
 - b) Aufnahme von Aminosäuren in Chloroplasten
 - c) Aufnahme von Kohlendioxid in Chloroplasten
- VI DAS STROMA-pH ALS REGULATIONSFAKTOR DER
CO₂-FIXIERUNG
- a) CO₂-Fixierung in Abhängigkeit vom Stroma-pH
 - b) CO₂-Fixierung im Dunkeln
- VII DISKUSSION
- a) pH-Gradient über die Thylakoid- und Innenmembran und Stroma-pH
 - b) Einfluß des pH-Gradienten über die Innenmembran auf den Metabolittransport
 - c) Regulation der CO₂-Fixierung
- VIII ZUSAMMENFASSUNG
- IX VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN
- X LITERATURVERZEICHNIS

I EINLEITUNG

Die Zellen der Eukaryonten sind - im Gegensatz zur Prokaryontenzelle - in verschiedene Räume unterteilt (Zellkern, Mitochondrien, Lysosomen usw.), die jeweils auf bestimmte Stoffwechselfunktionen spezialisiert sind. Der intrazelluläre Metabolismus erfordert ein komplexes Zusammenspiel der Stoffwechselabläufe in den verschiedenen Organellen, wofür die Aufrechterhaltung eines konstanten Milieus in den einzelnen Kompartimenten Voraussetzung ist. In diesem Zusammenhang stellt das pH einen wichtigen Parameter dar, wie z.B. die unterschiedlichen pH-Optima lysosomaler und cytoplasmatischer Enzyme zeigen. Die Bestimmung eines "intrazellulären" pH, wie für Muskelzellen (Waddell u. Butler, 1959), Leberzellen (Williams u. Woodbury, 1971; Sies et al. 1973) und Ehrlich-Aszites-Zellen (Poole 1967) beschrieben, besitzt in diesem Zusammenhang nur beschränkte Aussagekraft, da sie keine Rückschlüsse auf die Protonenkonzentrationen in den einzelnen Kompartimenten zuläßt. Dafür sind Messungen in den isolierten, funktionstüchtigen Organellen notwendig, wie sie bereits für Mitochondrien (Addanki et al., 1968), Lysosomen (Reijngoud u. Tager, 1973) und Thylakoide osmotisch geschockter Chloroplasten (Rottenberg et al. 1972) beschrieben worden sind. Wir haben das hierbei angewandte Prinzip - die pH-abhängige An- bzw. Abreicherung schwacher Säuren und Basen (Waddell u. Butler, 1959) - zur pH-Bestimmung in isolierten Chloroplasten verwendet. Diese Organelle der Pflanzenzelle erschien uns aus mehreren Gründen - die am Schluß der Einleitung noch diskutiert werden - ein geeignetes Modell, um den Einfluß des pH auf Stoffwechselvorgänge zu untersuchen.

Wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, besteht der Chloroplast aus zwei Kompartimenten - dem Stroma- und Thylakoidraum- die durch das System der Thylakoidmembranen voneinander getrennt werden.

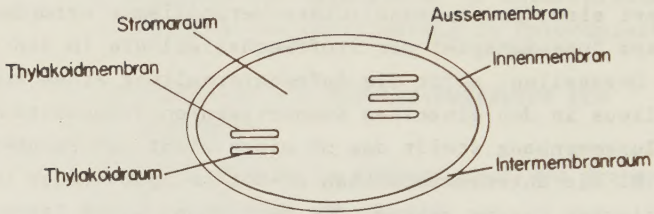


ABBILDUNG 1 - SCHEMATISCHER AUFBAU EINES CHLOROPLASTEN



ABBILDUNG 2 - ELEKTRONENMIKROSKOPISCHES BILD EINES SPINACHCHLOROPLASTEN

(aus Heldt u. Sauer 1970)

Die Abgrenzung zum Cytoplasma erfolgt durch ein Membransystem, das sich aus der Außen- und Innenmembran zusammensetzt. Der Chloroplast ist Sitz der Photosynthese, worunter man die Umwandlung des atmosphärischen Kohlendioxids in Kohlenhydrate unter Beteiligung von Lichtenergie versteht. Die Menge der organischen Substanz, die durch die Photosynthese grüner Pflanzen entsteht, wird auf 10^{10} - 10^{11} Tonnen im Jahr geschätzt. Der Prozeß läßt sich in zwei Teilreaktionen zerlegen:

a) In der photosynthetischen Elektronentransportkette, die aus den Photosystemen I und II besteht, wird Lichtenergie zur Bildung von ATP und NADPH verwendet (Abb.3). Dieser Vorgang konnte der Thylakoidmembran zugeordnet werden.



ABBILDUNG 3 - SCHEMA DER PHOTOSYNTHETISCHEN ELEKTRONEN-TRANSPORTKETTE (aus Menke,1972)

b) Das gebildete NADPH und ATP wird in einer Folgereaktion, für die keine Lichtenergie mehr benötigt wird, zur Reduktion des Kohlendioxids verwendet, wobei als Primärprodukt Dihydroxyacetonphosphat entsteht (Abb. 4). Die dafür notwendigen Enzyme des Calvinzyklus sind im Stromaraum lokalisiert.

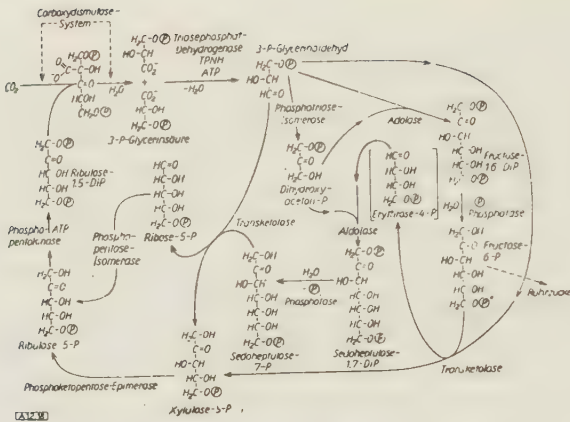


ABBILDUNG 4 - SCHEMA DER CO₂-FIXIERUNG VIA CALVIN-ZYKLUS
(aus Calvin 1962)

Zwischen Chloroplast und Cytoplasma findet ein reger Stoffaustausch statt, da ein großer Teil der Photosyntheseprodukte in das Cytoplasma ausgeschleust wird (Übersichtsreferate siehe Walker, i. Dr.; Heber, 1974). Während die Außenmembran für niedermolekulare Substanzen (z.B. Saccharose) frei permeabel ist, stellt die Innenmembran eine selektive Permeabilitätsschranke dar (Heldt u. Sauer, 1971; vgl. auch Abschnitt V). In den letzten Jahren konnten der Innenmembran drei Carrier zugeordnet werden, die den Transport wichtiger Metabolite in beiden Richtungen ermöglichen:

a) Phosphatcarrier (Heldt u. Rapley, 1970; Werdan u. Heldt, 1972; Heldt et al., 1974):

Transport von Phosphat, 3 Phosphoglycerat und Dihydroxyacetonphosphat.

b) Dicarboxylatcarrier (Heldt u. Rapley, 1970; Lehner u. Heldt, 1973; Heldt et al. 1974):

Transport von Malat, Oxalazetat, Succinat, Aspartat, Glutamat.

c) Adeninnukleotidcarrier (Heldt, 1969):

Transport von ATP, in geringerem Maße von ADP.

Wie Experimente mit isolierten Thylakoiden gezeigt haben, findet bei Belichtung ein aktiver Protonentransport aus dem Medium in den Thylakoidraum statt (Neumann u. Jagendorf, 1964), dem im Rahmen der chemiosmotischen Hypothese bei der Photosphorylierung eine besondere Bedeutung beigemessen wird (Zusammenfassung siehe Witt et al., 1968; Rumberg u. Siggel, 1969; Hager, 1969; Gaensslen u. Mc Carty, 1971; Rottenberg et al., 1972). Unser Ziel war es, das pH im Stroma- und Thylakoidraum isolierter Chloroplasten gleichzeitig zu bestimmen und die Auswirkungen dieses Protonentransports auf die im Stromaraum lokalisierten Stoffwechselvorgänge zu untersuchen.

Die hohe Stoffwechselaktivität, der rege Metabolit-austausch mit dem Cytoplasma und der physiologischerweise stattfindende Protonentransport über die Thylakoidmembran machen den Chloroplasten zu einem interessanten Studienobjekt, um mögliche regulatorische Funktionen des pH in einem Zellkompartiment zu untersuchen.

Im folgenden wird zuerst eine Methode beschrieben, die es gestattet, gleichzeitig das pH im Stroma- und Thylakoidraum zu messen (Abschnitt III). Teil IV schildert die pH-Änderungen in Chloroplasten, wie sie bei Belichtung auftreten. Außerdem werden Möglichkeiten aufgezeigt, das pH spezifisch zu variieren. In Abschnitt V wird eine Charakterisierung des Phosphatcarriers gegeben und der Aufnahmemechanismus von Kohlendioxid und Aminosäuren in die Chloroplasten beschrieben. Die Bedeutung des pH-Gradienten über die Innenmembran wird diskutiert. Aus den Experimenten des Abschnittes VI geht hervor, daß das Stroma-pH bei der Regulation der CO_2 -Fixierung beteiligt ist.

II METHODISCHER TEIL

a) Präparation der Chloroplasten und Inkubationsbedingungen

Spinatchloroplasten wurden nach der Methode von Cockburn et al. (1968) - modifiziert nach Heldt und Sauer (1971) - isoliert. Nach der Präparation wurden die Chloroplasten in folgendem Medium aufgenommen: Sorbit 0.33M; N-2Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure (HEPES) 50mM pH 7.6, neutralisiert mit NaOH; MnCl_2 1mM; MgCl_2 1mM; EDTA 2mM. Falls nicht anders angegeben, wurden in diesem Medium auch die Experimente durchgeführt. Die Prüfung der Präparation mit dem Phasenkontrastmikroskop (Leech 1966) ergab, daß 70-90% der Chloroplasten intakt waren. Weiterhin wurde als quantitative Bestimmung die Ferricyanidabhängige Sauerstoffentwicklung verwendet (Heber u. Santarius, 1970). Sie zeigte, daß etwa 80-95% der Chloroplasten für Ferricyanid impermeabel waren. Chlorophyll wurde nach der Methode von Whatley und Arnon (1963) bestimmt. Zur Belichtung der Chloroplasten wurde eine Wolfram-Halogenlampe mit einem RG 630-Filter (Fa. Schott, Mainz) und einem Calflex C-Hitzefilter (Fa. Balzers, Lichtenstein) verwendet. Die Lichtintensität betrug - wenn nicht anders angegeben - $80\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec.}$ (bei den Experimenten in Abschnitt V/c $50\,000\text{ erg/cm}^2\text{ sec.}$). Die Belichtung wurde 3 Minuten vor der Messung begonnen und auch während der Zentrifugation fortgesetzt (mit Ausnahme der Messungen in Abschnitt V/c). Bei tiefen Temperaturen (4°C , 8°C) kann die Zentrifugation auch im Dunkeln vorgenommen werden, ohne das Ergebnis zu beeinflussen.

Folgende radioaktive Substanzen wurden verwendet:

- ^{14}C -DMO (0.3-1Ci/Mol; New England Nuclear, Boston USA);
- ^{14}C -Methylamin (6Ci/Mol; New England Nuclear, Boston USA);
- ^{14}C - NaHCO_3 (0.1-10Ci/Mol; Amersham, Braunschweig);
- ^3H HO (1 $\cdot$ 10 $^{-4}$ Ci/Mol; Amersham, Braunschweig);
- ^{14}C -Sorbit (1 $\cdot$ 10 $^{-3}$ Ci/Mol; New England, Nuclear Boston USA);
- ^{14}C -Saccharose (5 $\cdot$ 10 $^{-2}$ Ci/Mol; New England Nuclear, Boston USA);

- ¹⁴C-p-Nitrophenol (10Ci/Mol I.C.N. Irvine USA);
¹⁴C-markierte Aminosäuren (vgl. Abschnitt V b)
 (0.03-3Ci/Mol; Amersham, Braunschweig);
³²P-H₃PO₄ (0.3-1Ci/Mol, Amersham, Braunschweig);
¹⁴C-3PGS (0.3-1Ci/Mol, Boehringer, Mannheim),

b) Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation

1.) Meßtechnik: Die Silikonölfiltrationszentrifugation - Klingenberg u. Pfaff (1967)); Heldt u. Sauer (1971) - wurde mit einer Beckman - Mikrozentrifuge unter Verwendung von 0.4ml Polypropylen - und Polyäthylen-Röhrchen (W.Sarstedt, Numbrecht-Rommelsdorf) durchgeführt. In die Röhrchen wurden 20 µl 1M HClO₄ gegeben, kurz zentrifugiert und darauf 70 µl Silikonöl (Wacker Chemie, München, AR 100: AR 150 = 3:1) pipettiert.

Anhand der Bestimmung des Sorbitraumes und des sorbitimpermeablen Wasserraumes von Spinatchloroplasten soll die Methode verdeutlicht werden:

Nach der Präparation werden die Chloroplasten im Medium suspendiert (20-60 µg Chlorophyll/ml), das tritiiertes Wasser (³H₂O) mit einer spezifischen Aktivität von 10⁻⁴Ci/Mol enthält. Jeweils 300 µl dieser Suspension werden in ein Polyäthylenröhrchen pipettiert und mit 10 µl ¹⁴C-Sorbit (0.1µC) bzw. ¹⁴C-Saccharose (0.1µC, 300mM) für eine Minute (gemessen bei 20°C) bzw. 3 Minuten (4°C) inkubiert. Danach werden die Chloroplasten durch die Ölschicht zentrifugiert und in der Perchlorsäure denaturiert. Die Zentrifuge erreicht ihre maximale Geschwindigkeit in weniger als einer Sekunde. Die Trennung der Chloroplasten vom Medium geschieht innerhalb von drei Sekunden nach Beginn der Zentrifugation.

Aufarbeitung: Zur Radioaktivitätsmessung werden 50 µl vom Überstand entnommen. Die Spitze des Röhrchens wird dann knapp über der Perchlorsäure in der Ölschicht abgeschnitten und in ein Mikroreaktionsgefäß (1.5ml, Fa. Netheler&Hinz, Hamburg) mit 300 µl H₂O gegeben. Nach kräftigem maschinellen Schütteln und Zentrifugieren werden 200 µl des Überstandes zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Die Radioaktivitätsbestimmung (¹⁴C-Einfach, ¹⁴C-³H und ³²P-³H - Doppelmarkierung) erfolgte mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Fa. Philips) mit Quenchkorrektur.

Die Szintillatorflüssigkeit setzte sich folgendermaßen zusammen: 60 g Butyl-PBD + 6 l Toluol + 4 l Methylglykol.

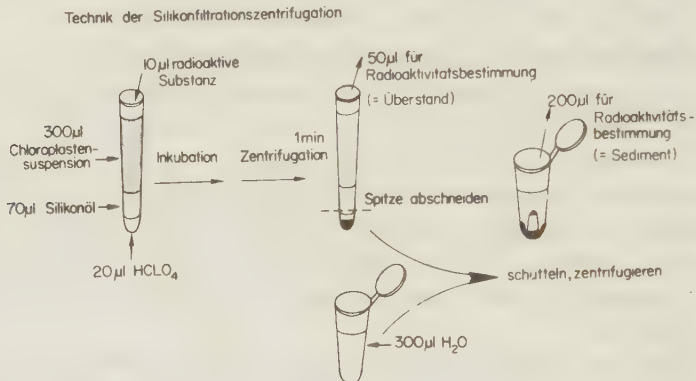


ABBILDUNG 5 - TECHNIK DER SILIKONÖLFILTRATIONSZENTRIFUGATION

2.) Berechnung des Sorbitraumes und des sorbitimpermeablen Chloroplastenraumes

Die Bestimmung des Sorbit- und Wasserraumes basiert auf der Messung des Anteils des radioaktiven Überstandes (in µl), der sich nach der Zentrifugation im Sediment befindet. Bezieht man den erhaltenen Wert auf die eingesetzte Menge Chloroplasten (in mg Chlorophyll), so erhält man den Sorbit- bzw. Wasserraum - gemessen mit ¹⁴C-Sorbit bzw. ³H₂O - in µl/mg Chlorophyll.

$$\text{Raum} = \frac{\text{dpm}_{\text{Sed}} \cdot \mu\text{l } \text{Üb.}}{\text{dpm}_{\text{Üb.}} \cdot \text{mg Chl. Probe}} \quad \text{in } \mu\text{l/mg Chlorophyll}$$

dpm_{Sed} = Gesamtaktivität im Sediment in dpm

$\text{dpm}_{\text{Üb.}}$ = Gesamtaktivität im Überstand zu Beginn der Messung in dpm

$\mu\text{l}_{\text{Üb.}}$ = Gesamtvolumen des Überstandes (=Chloroplastensuspension + radioaktiver Zusatz)

mg Chl. Probe = Chlorophyllgehalt der pro Röhrchen eingesetzten Chloroplastenmenge

Da die Innenmembran für Sorbit (analog Saccharose) impermeabel ist (Heldt u. Sauer, 1971), setzt sich der Sorbitraum aus zwei Anteilen zusammen:

a) Volumen des bei der Zentrifugation mitgerissenen Mediums

b) Volumen des Intermembranraumes.

Der Wasserraum repräsentiert das gesamte Chloroplastenvolumen und den Anteil des mitgerissenen Mediums. Der sorbitimpermeable Chloroplastenraum (= Raum innerhalb der Innenmembran) errechnet sich aus der Differenz von Wasserraum-Sorbitraum. Er macht etwa 50-60% des Gesamtwasserraumes aus und betrug in unseren Experimenten 13 - 41 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll. Der sorbitimpermeable Wasserraum wird von folgenden Faktoren nicht beeinflusst:

Variation der Lichtintensität (Abb. 10); pH im Medium (Abb. 14); Zugabe von CCCP (Abb. 11); Methylamin (Abb. 13); Nigericin (Abb. 12); Azetat (Abb. 31).

Sorbit- und Wasserraum wurden in jedem Experiment bestimmt.

3.) Berechnung der Substanzaufnahme in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum:

Bei der Berechnung der Aufnahme einer radioaktiv markierten Verbindung in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum muß die im Sorbitraum vorliegende Radioaktivität von der Gesamtaktivität im Sediment subtrahiert werden. ($\text{dpm}_{\text{Sed}} - \alpha \cdot \text{dpm}_{\text{UD}}$). Die Division der im Sediment verbleibenden Radioaktivität durch die spezifische Aktivität (dpm/nmole) und die eingesetzte Chlorophyllmenge (mg) ergibt die in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum aufgenommene Menge in nmole/mg Chlorophyll. Die weitere Division durch den (H_2O -Sorbit)-Raum (in μl) liefert die in diesem Kompartiment vorliegende Konzentration in mM .

Konzentration im sorbitimpermeablen Chloroplastenraum =

$$\alpha = \frac{(\text{dpm}_{\text{Sed}} - \alpha \cdot \text{dpm}_{\text{Üb.}})}{\text{sp. Akt.} \cdot \text{mg Chl. Probe} \cdot (\text{H}_2\text{O-Sorbit})\text{-Raum}}$$

$$\alpha = \frac{\text{dpm } ^{14}\text{C-Sorbit}_{\text{Sed}}}{\text{dpm } ^{14}\text{C-Sorbit}_{\text{Üb.}}} \quad \left(\begin{array}{l} \text{stammt aus der Bestimmung} \\ \text{des Sorbitraumes} \end{array} \right)$$

sp. Akt. = spezifische Aktivität der Substanz in dpm/nmole
(H₂O-Sorbit)-Raum = sorbitimpermeabler Chloroplastenraum in
µl/mg Chlorophyll.

dpm_{Sed} = Gesamtaktivität im Sediment

dpm_{Üb.} = Gesamtaktivität im Überstand zu Beginn der Messung.

Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, daß weniger als 1% der eingesetzten Radioaktivität nach Zentrifugation im Sediment erscheint. Die gezeigten Ergebnisse repräsentieren jeweils einen Durchschnittswert aus simultan durchgeführten Dreifachmessungen.

4.) Modifikation der Technik bei Messung der Aufnahme von ¹⁴C-Bikarbonat

Das Polyäthylenröhrchen enthält statt Perchlorsäure 20 µl NaOH 2.5N. Nach der Zentrifugation werden zum Überstand 20 µl NaOH 2.5N gegeben, um eine Diffusion des ¹⁴C-CO₂ durch das Silikonöl in die Sediment-Fraktion bei der Aufarbeitung zu verhindern. Dazu sei folgendes Kontrollexperiment angeführt: Die Aktivität an ¹⁴C-Bikarbonat (0.5mM) im Überstand beträgt 540 000 dpm. Nach Zugabe von Chloroplasten (20µg) und Zentrifugation findet man im Sediment 11 300 dpm. Zentrifugiert man ein Röhrchen ohne Chloroplasten, so enthält das Sediment 103 dpm, nach 7-tägiger Lagerung der Röhrchen bei 4°C 92 dpm. Damit ist gezeigt, daß keine Diffusion von ¹⁴C-CO₂ durch die Silikonschicht stattge-

funden hat. Zur Bestimmung der Menge des fixierten Kohlenstoffs im Sediment wurden 100 μl in 500 μl 0.2M Salzsäure für 15 Minuten auf 90°C erhitzt und anschließend gezählt. Die Aktivität des gesamten ^{14}C -Kohlenstoffs im Sediment wurde mit weiteren 100 μl bestimmt.

5.) Modifikation der Technik bei der pH-Bestimmung mit DMO und Methylamin

Bei der pH-Bestimmung im Stroma- und Thylakoidraum wurden jeweils zwei Polypropylenröhrchen verwendet, von denen das eine ^{14}C -DMO (Endkonzentration 1mM), und nicht radioaktiv markiertes Methylamin (Endkonzentration 0,03mM), das andere ^{14}C -Methylamin und nicht radioaktiv markiertes DMO enthielt. Die Inkubationszeit betrug bei niedriger Temperatur (4°C, 8°C) 5 Minuten, bei 20°C 1 Minute.

Wurde nur das pH im Stromaraum mit 1mM ^{14}C -DMO bestimmt, so wurde die Messung wie im Abschnitt II b 1) beschrieben durchgeführt. Zur pH-Berechnung siehe Abschnitt III.

c) Messung der Carboanhydrase - Aktivität (Wilbur u. Anderson, 1948)

10g Spinatblätter wurden 5 bzw. 10 mal für 15 Sekunden mit Intervallen (15 Sekunden) mit einem Homogenisator (Fa. Bühler Tübingen) bei 0°C homogenisiert. (Medium: 5mM MgCl_2 ; 10mM Natriumpyrophosphat (pH 7.9).

Die Messung erfolgte mit 0.1ml Homogenat in 5ml 0.1M Natriumbarbiturat pH 8.2 + 5ml H_2O gesättigt mit CO_2 bei 0°C. Als Maß der Aktivität der Carboanhydrase diente die Geschwindigkeit der pH-Änderung zwischen pH 8.0 und 8.2. Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion wurde mit 0.1ml H_2O statt Homogenat bestimmt. Die Skaleneichung erfolgte durch Zugabe von definierten Mengen Salzsäure. Mit intakten Chloroplasten wurde die Messung mit 0.33M Sorbit durchgeführt. Osmotisch geschockte Chloroplasten wurden durch Zugabe von 9 Volumenanteilen destilliertem Wasser zu 1 Volumenanteil Chloroplasten hergestellt.

d) Messung der CO_2 -Fixierung und Phosphoglyzeratreduktion mit gleichzeitiger pH-Bestimmung

Die Raten wurden über den bei der Reaktion gebildeten Sauerstoff (Polarographische Messung mit der Sauerstoffelektrode) bestimmt (Walker u. Hill, 1967). Das Gesamtvolumen betrug jeweils 550 μl , die eingesetzte Chlorophyllmenge ist bei den einzelnen Experimenten aufgeführt (vgl. Abschnitt VIa). Alle Experimente wurden bei 20°C durchgeführt.

Das verwendete Medium hatte folgende Zusammensetzung: 0.33M Sorbit; 50mM HEPES pH 7.6; 1mM MgCl_2 ; 1mM MnCl_2 ; 2mM EDTA; $^3\text{HHO } 10^{-4}\text{Ci/Mol}$. Vor Beginn des Experimentes wurde das erforderliche pH eingestellt und das Medium mit Stickstoff durchgeperlt.

α) Endkonzentrationen der Zusätze bei der Messung der CO_2 -Fixierung:

2mM NaHCO_3 ; 0.25mM NaH_2PO_4 ; 1mM ^{14}C -DMO (0.5Ci/Mol) bzw. 1mM DMO + 0.03mM Methylamin (siehe unten).

β) Endkonzentrationen der Zusätze bei Messung der Phosphoglyzeratreduktion:

2mM Na-3-Phosphoglyzerat, 3mM NaH_2PO_4 ; 1mM ^{14}C -DMO (0.5Ci/Mol) bzw. 1mM DMO + 0.03mM Methylamin (siehe unten).

Gleichzeitig wurde bei der CO_2 -Fixierung und Phosphoglyzeratreduktion entweder das pH im Stroma-Raum oder das pH im Stroma- und Thylakoidraum gemessen. Die pH-Bestimmung wurde, wie in Abschnitt IIb)5 beschrieben, durchgeführt.

γ) gleichzeitige pH-Stroma-Messung: Die Ansätze enthalten 1mM ^{14}C -DMO. Nach Beendigung der Messung an der Sauerstoffelektrode (nach 5-7 Minuten) werden 2x200 μl in Polypropylenröhrchen pipettiert, für eine weitere Minute belichtet und anschließend zentrifugiert, wobei die Belichtung während der Zentrifugation fortgesetzt wird. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie in Abschnitt IIb) beschrieben.

δ) gleichzeitige Bestimmung des pH im Stroma- und Thylakoidraum: Die Ansätze für die CO_2 -Fixierung bzw. Phosphoglyzeratreduktion enthalten 1mM DMO und 0.03mM Methylamin. Die pH - Bestimmung wurde unter identischen Bedingungen (gleiche Meßzeit, Medium mit Stickstoff durchgeperlt, gleiche Zusätze) wie in Abschnitt IIb)5 beschrieben, durchgeführt.

Die pH-Bestimmung ergab bei der Phosphoglyzerat-Reduktion im Durchschnitt geringfügig höhere Werte als bei der CO_2 -Fixierung. Für die Abb. 32 und 33 wurden Mittelwerte aus beiden Messungen verwendet.

Die pH-Berechnung wird im Abschnitt III abgehandelt.

e) CO_2 -Fixierung im Dunkeln

1.) Allgemeines: Die Chloroplasten wurden wie in Abschnitt IIa beschrieben isoliert; bei der letzten Zentrifugation wurde anstatt 50mM HEPES pH 7.6, 50mM TRICINE pH 8.8 verwendet. Der Überstand wurde abgegossen und das Chloroplastensediment bis zu Beginn der Messung bei 0°C aufbewahrt.

Das Inkubationsmedium setzte sich folgendermaßen zusammen (Änderungen siehe bei den einzelnen Experimenten): Sorbit 0.33M, TRICINE pH 8.8 50mM; MgCl_2 1mM; MnCl_2 1mM; EDTA 2mM; Dihydroxyazetonphosphat 5mM; Oxalazetat 5mM; NaH_2PO_4 (pH 8.8) 16mM; $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ 10mM; Dithiothreitol (DTT) 5mM. (Alle Angaben erfolgen in Endkonzentrationen in der Inkubationslösung nach der Zugabe der Chloroplasten).

Die Lösungen - mit Ausnahme von $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ - wurden erst kurz vor Beginn der Messung zusammenpipettiert, das pH auf 8.8 eingestellt und anschließend die entsprechende Menge $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ zugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Chloroplasten. Nach 4 und 6 Minuten wurden jeweils 100 μl Suspension in 100 μl NaOH 2N gespritzt. Mit 20 μl davon wurde die Bestimmung der spezifischen Aktivität von $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ durchgeführt, weitere 100 μl wurden mit 500 μl HCl 1N vermischt und bis zur Trockne bei 90°C eingedampft. Wie hier nicht gezeigte Kontrollexperimente mit $^{14}\text{C-PGS}$ gezeigt haben, geht hierbei keine Radioaktivität organischen Kohlenstoffs verloren. Nach Zugabe von 100 μl HClO_4 2M werden die Proben zur Bestimmung der Menge des fixierten Kohlenstoffs gezählt.

Aus der zwischen 4 und 6 Minuten (=linearer Meßbereich) gebildeten Menge fixierten Kohlenstoffs wurde die CO_2 -Fixierungsrate in $\mu\text{mole Kohlenstoff/mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ errechnet. Als Kontrollwert diente die Messung ohne Dihydroxyazetonphosphat.

Die dabei fixierte Menge Kohlenstoff (maximal 1%) wurde von der Gesamtmenge abgezogen. Dihydroxyazetonphosphat wurde aus Dihydroxyazetonphosphatdimethylketal (Fa. Boehringer, Mannheim) nach Vorschrift hergestellt.

2.) Spezielle Hinweise zu den einzelnen Experimenten (siehe auch Abschnitt VIb).

Experimente der Tabelle 22 und Abbildung 37: Zu jeweils 200 μ l Inkubations-Medium wurden 50 μ l Chloroplasten gegeben.

Experiment der Abbildungen 38/39: Die Chloroplasten wurden nach der Isolation zu gleichen Teilen auf Medium mit pH 7.2; 7.6; 8.0; 8.4; 8.6; 8.8; 9.0 aufgeteilt.

α) Messung der Dupkelfixierung: Zu jeweils 200 μ l Inkubationsmedium ($^3\text{HHO}:10^{-4}\text{Ci/Mol}$, ohne Bikarbonat) entsprechenden pH-Wertes wurden 50 μ l Chloroplastensuspension (gleiches pH) gegeben. Der Start der Messung erfolgte durch die Zugabe von 10 μ l DMO 27mM und 10 μ l $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ 194mM.

β) pH-Stroma-Messung: Zu jeweils 200 μ l Inkubationsmedium ($^3\text{HHO}:10^{-4}\text{Ci/Mol}$, ohne Bikarbonat) entsprechenden pH-Wertes wurden 50 μ l Chloroplastensuspension (gleiches pH) gegeben. Der Start der Messung erfolgte durch die Zugabe von 10 μ l $^{14}\text{C-DMO}$ 27mM und 10 μ l NaHCO_3 194mM. Nach 4 und 6 Minuten werden jeweils 100 μ l abgenommen und damit wie unter Abschnitt IIb) 5 beschrieben - das pH im Stromaraum bestimmt. Dabei ergaben die Messungen bei 4 und 6 Minuten die gleichen Ergebnisse. Für Abb. 39 wurde der Mittelwert aus beiden Zeiten verwendet.

Experiment der Abbildung 36: Das Inkubationsmedium enthält : Sorbit 0.33M, TRICINE pH 8.8 50mM; MgCl_2 1mM; MnCl_2 1mM; EDTA 2mM; Dihydroxyazetonphosphat 1mM; Oxalazetat 1mM; NaH_2PO_4 3mM; NaHCO_3 10mM; Dithiothreitol 10mM (Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen nach Zugabe der Chloroplasten).

Zu 2ml Inkubationsmedium werden 500 μ l Chloroplasten gegeben. Zu den angegebenen Zeiten werden 2x100 μ l entnommen und mit je

100 μl HClO_4 1.2M denaturiert. Die Neutralisation der Proben erfolgte mit TRAP-KOH (1M TRAP-5M KOH). Der nach der Zentrifugation verbleibende Überstand (= Extrakt) wird zur Bestimmung von Dihydroxyazetonphosphat, 3-Phosphoglyzerat und Malat verwendet. (Die enzymatischen Bestimmungen erfolgten nach Bergmeyer, 1970).

α) Enzymatische Bestimmung von Dihydroxyazetonphosphat mit Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH):

Testansatz: 750 μl TRAP 100mM pH 7.6
 50 μl Extrakt
 5 μl NADH 10mM

Der Start erfolgte durch Zugabe von 5 μl GDH, die Messung wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 334 \text{ nm}$ durchgeführt.

β) Enzymatische Bestimmung von 3-Phosphoglyzerat mit Phosphoglyzerat-Kinase (PGK) und Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH):

Testansatz: 600 μl Test-Mix
 5 μl NADH 10mM
 50 μl Extrakt

Der Start erfolgte durch Zugabe von 5 μl Enzymlösung (PGK + GAP-DH), die Messung wurde bei der Wellenlänge $\lambda = 334 \text{ nm}$ durchgeführt.

Testmix: in 100 ml TRAP pH 7,6 100 mM sind enthalten:

203.3 mg MgCl_2
 33 mg Hydrazinsulfat
 60 mg ATP
 78 mg EDTA

γ) Enzymatische Bestimmung von Malat im gekoppelten optischen Test mit Malat-Dehydrogenase (MDH)

Testansatz: 550 μl Test-Mix
 50 μl Extrakt

Der Start erfolgte durch Zugabe von 5 μl MDH, die Messung wurde bei den Wellenlängen $\lambda = 365 \text{ nm} - 440 \text{ nm}$ durchgeführt (molarer

Extinktionskoeffizient $\epsilon = 9.1 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$.

Testmix: in 4ml Piperazinpuffer 100mM pH 9.2 sind enthalten:

20 μl APAD (3Acetyl-Pyridinadenindinukleotid) 100mM

50 μl Acetylphosphat 50mM

50 μl Coenzym A 50mM

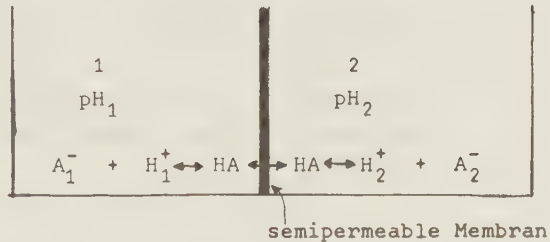
20 μl Citratsynthetase + Phosphotransazetylase

Die DAP- und PGS-Bestimmung wurde mit einem Eppendorf-Photometer, die Malatbestimmung mit einem Perkin-Elmer-Doppelstrahlphotometer durchgeführt.

Experiment der Abbildung 35: Die elektrophoretische Auftrennung wurde nach Schürmann (1969) durchgeführt. Sie erfolgte auf Zellulose-Dünnschichtplatten (Länge 20cm, DC Fertigplatten, Merck, Darmstadt, Laufzeit 1 Stunde, Laufmittel 10ml Pyridin, 35ml Essigsäure, 955ml H_2O) Für die Radioaktivitätsmessung wurde ein TLC-Scanner (Berthold-Friesecke, Karlsruhe) verwendet.

III. pH - MESSUNG IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM INTAKTER SPINATCHLOROPLASTEN

a) Prinzip:



Ein Gedankenexperiment soll das Prinzip der verwendeten pH-Bestimmung verdeutlichen:

Ein Behälter sei durch eine semipermeable Membran - die nur für ungeladene Moleküle passierbar ist - in die beiden Räume 1 und 2 aufgeteilt. In beiden befinden sich Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH (pH_1/pH_2). Gibt man nun in das Kompartiment 1 die schwache Säure HA, so wird diese in der undissoziierten Form die Membran permeieren, und es wird sich in beiden Räumen ein Dissoziationsgleichgewicht einstellen.

$$\frac{[A^-]_1 \cdot [H^+]_1}{[HA]} = K ; \quad \frac{[A^-]_2 \cdot [H^+]_2}{[HA]} = K ;$$

Da die Konzentration der ungeladenen Form auf beiden Seiten der Membran gleich ist, gilt:

$$\frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} = \frac{[A^-]_2}{[A^-]_1}$$

Über die Bestimmung von $[A^-]_1$, $[A^-]_2$ und pH_1 läßt sich das pH im zweiten Kompartiment berechnen:

$$\text{pH}_2 = \text{pH}_1 + \log \frac{[A^-]_2}{[A^-]_1}$$

Verwendet man statt HA die schwache Base B, so erhält man:

$$\frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} = \frac{[BH^+]_1}{[BH^+]_2} \quad \text{und} \quad pH_2 = pH_1 + \log \frac{[BH^+]_1}{[BH^+]_2}$$

Die Kationenkonzentration verhält sich also proportional, die Anionenkonzentration umgekehrt proportional der Wasserstoffionenkonzentration:

$$\frac{[H^+]_1}{[H^+]_2} = \frac{[BH^+]_1}{[BH^+]_2} = \frac{[A^-]_2}{[A^-]_1}$$

Dieses System läßt sich nun auf unsere Experimente übertragen. Das Kompartiment 1 stellt das Medium mit dem eingestellten pH_1 und dem zu berechnenden $[A^-]_1$ bzw. $[BH^+]_1$ dar. Bestimmt man nun $[A^-]_2$ bzw. $[BH^+]_2$ - d.h. die Konzentration im Raum 2 - den Chloroplasten - so läßt sich pH_2 berechnen.

b) pH-Messung in isolierten Chloroplasten

Unsere pH-Messungen wurden mit den schwachen Säuren 5.5 Dimethyloxazolidin-2.4dion (DMO) und Kohlensäure, sowie der schwachen Base Methylamin (MA) durchgeführt. DMO wurde bereits zur pH-Bestimmung in Geweben (Waddell u. Butler, 1959) und in Mitochondrien (Addanki et al., 1968) verwendet. Mit Methylamin wurde schon früher das pH des Thylakoidraums von "gebrochenen Chloroplasten" bestimmt (Rottenberg et al., 1972).

Wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, werden zur Berechnung des pH-Wertes die Konzentrationen der Anionen bzw. Kationen der verwendeten Substanzen in den verschiedenen Kompartimenten benötigt. Ein beträchtlicher Teil des DMO ($pK = 6.64$ bei $4^\circ C$, $pK = 6.38$ bei $20^\circ C$, Addanki et al., 1968) liegt bei unseren Versuchsbedingungen ($pH \text{ Medium} = 7.0 - 8.5$) jedoch in undissoziierter Form vor. Zur Berechnung der DMO-Anionenkonzentration im Medium - $[D^-]_m$ - muß die Konzentration des ungeladenen DMO - $[DH]_m$ - von der eingesetzten DMO-Total - Konzentration - $[D^{tot}]_m$ - im Medium abgezogen werden:

$$[D^-]_m = [D^{tot}]_m - [DH]_m \quad [DH]_m = \frac{[D^{tot}]_m}{1 + 10^{pH_m - pK}}$$

(Ableitung über Henderson - Hasselbalchsche Beziehung)

Da die Konzentration des ungeladenen DMO im Medium und im Chloroplasten gleich groß ist - $[DH]_m = [DH]_c$ -, läßt sich die DMO-Anionenkonzentration im sorbitimpermeablen Chloroplastenraum $[D^-]_c$ ebenfalls leicht berechnen.

$$[D^-]_c = [D^{tot}]_c - [DH]_m$$

In gleicher Weise wird bei der pH-Bestimmung mit Kohlensäure ($pK_{CO_2/HCO_3^-} = 6.2$, Maren, 1967) für die ungeladene H_2CO_3 korrigiert. Mit Methylamin ($pK = 10.8$, Rottenberg et al., 1972) ist eine solche Korrektur nicht notwendig, da bei unseren Versuchsbedingungen die Konzentration der ungeladenen Form vernachlässigt werden kann.

Tabelle 1 zeigt ein Experiment, in dem die Aufnahme von ^{14}C -DMO und ^{14}C -Methylamin in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum gemessen wurde. Um identische Bedingungen zu erhalten, wurden beide Messungen jeweils gleichzeitig ausgeführt, wobei die eine Probe ^{14}C -DMO und unmarkiertes Methylamin, die andere ^{14}C -Methylamin und unmarkiertes DMO enthielt.

Ist das pH im Chloroplasten alkalischer als im Medium, so sollte man eine Anreicherung der DMO-Anionen und eine Abreicherung der Methylamin-Kationen erwarten, liegt das Chloroplasten-pH unter dem des Mediums, so sollte man das umgekehrte bekommen. Es erscheint im ersten Augenblick paradox, daß in diesem Experiment sowohl die anionische Verbindung DMO, als auch die kationische Verbindung Methylamin in den Chloroplasten angereichert wird. Vorausgesetzt, daß beide Substanzen zur pH-Bestimmung geeignet sind, muß man folgern, daß der Chloroplastenraum kein einheitliches Kompartiment darstellt, sondern aus zwei verschiedenen Räumen besteht. Der eine Raum müßte einen pH-Wert niedriger als das Medium, der andere ein alkalischeres pH besitzen. Tatsächlich findet man im elektronenmikroskopischen Bild zwei verschiedene Räume: den Stromaraum und den Thylakoidraum.

TABELLE 1

pH - MESSUNG IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM ISOLIERTER CHLOROPLASTEN.

Inkubationsbedingungen siehe methodischer Teil und Legende der Abb. 8 Temp. 8°C.

Räume (in $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll)

sorbitimpermeabler Chloroplastenraum	V_C	26.3
Thylakoidraum (0.125 V_C)	V_T	3.3
Stromaraum (0.875 V_C)	V_S	23.0

eingesetzte Konzentrationen im Medium (μM)

DMO-Anionen	$[D^-]_m$	900
Methylamin-Kationen	$[M^+]_m$	30.0

gemessene Konzentrationen im sorbitimpermeablen Chloroplastenraum (μM)

DMO-Anionen	$[D^-]_c$	1480
Methylamin-Kationen	$[M^+]_c$	383

berechnete Konzentrationen (μM)

	1.Lösung	2.Lösung
	Stromaraum alkal.	Thylakoid- raum alkal.
	als Thylakoidraum	als Stromaraum (siehe Text)
DMO-Anionen im Stromaraum	$[D^-]_S$ 1691	(61.8)
Methylamin-Kationen im Stromaraum	$[M^+]_S$ 16.0	(437)
DMO-Anionen im Thylakoidraum	$[D^-]_T$ 9.2	(11366)
Methylamin-Kationen im Thylakoidraum	$[M^+]_T$ 2937	(2.4)
pH im Medium	7.60	
berechneter pH-Wert		
Stromaraum	pH_S 7.87	(6.44)
Thylakoidraum	pH_T 5.61	(8.70)
pH-Gradient über die Thylakoidmembran	ΔpH 2.26	(-2.26)

* zwei Lösungen möglich (siehe Text)

Mißt man die Aufnahme sowohl einer schwachen Säure -DMO- als auch einer schwachen Base - Methylamin- so ist es möglich, die vorher an zwei Kompartimenten geschilderte Methode zur pH-Bestimmung auch auf drei Räume anzuwenden und damit sowohl das pH des Stroma- als auch das des Thylakoidraumes zu bestimmen.

Die Berechnung basiert auf den folgenden vier Gleichungen:

$$\text{I. } [D^-]_m \cdot [M^+]_m = [D^-]_s \cdot [M^+]_s = \frac{D_s^-}{V_s} \cdot \frac{M_s^+}{V_s}$$

$$\text{II. } [D^-]_m \cdot [M^+]_m = [D^-]_T \cdot [M^+]_T = \frac{D_T^-}{V_T} \cdot \frac{M_T^+}{V_T}$$

$$\text{III. } D_C^- = D_s^- + D_T^-$$

$$\text{IV. } M_C^+ = M_s^+ + M_T^+$$

D_C^- , M_C^+ = Menge der DMO-Anionen bzw. Methylamin-Kationen im sorbitimpermeablen Chloroplastenraum (nmole/mg Chlorophyll)

D_s^- , M_s^+ = Menge der DMO-Anionen bzw. Methylamin-Kationen im Stromaraum (nmole/mg Chlorophyll)

D_T^- , M_T^+ = Menge der DMO-Anionen bzw. Methylamin-Kationen im Thylakoidraum (nmole/mg Chlorophyll)

Die Bedeutung der anderen Symbole geht aus der Tabelle 1 hervor. Diese vier Gleichungen können zu einer quadratischen Gleichung zusammengefaßt werden, die sich nach D_s^- auflösen läßt. $[D^-]_m$ und $[M^+]_m$ sind durch die Inkubationsbedingungen festgelegt. Die Summe von $V_s + V_T$ entspricht dem sorbitimpermeablen Chloroplastenraum, der mit der Silikonölfiltrationszentrifugation gemessen werden kann. Auf die Bestimmung der relativen Größe von V_s und V_T wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

$$\text{III. und IV in II. } \frac{(D_C^- - D_s^-)}{V_T} \cdot \frac{(M_C^+ - M_s^+)}{V_T} = [D^-]_m \cdot [M^+]_m$$

$$M_s^+ = M_C^+ - \frac{V_T^2 \cdot [D^-]_m \cdot [M^+]_m}{D_C^- - D_s^-}$$

Einsetzen in I und Umformung ergibt:

$$D_S^{-2} + D_S^{-} \left(\frac{[D^-]_m \cdot [M^+]_m}{M_C^+} \cdot (V_T^2 - V_S^2) - D_C^{-} \right) +$$

$$\frac{D_C^{-}}{M_C^+} \cdot [D^-]_m \cdot [M^+]_m \cdot V_S^2 = 0$$

d.h. wir haben jetzt eine Gleichung der Form $X^2 + ax + b = 0$
Mit $x = D_S^{-}$

$$a = \frac{[D^-]_m \cdot [M^+]_m}{M_C^+} \cdot (V_T^2 - V_S^2) - D_C^{-}$$

$$b = \frac{D_C^{-}}{M_C^+} \cdot [D^-]_m \cdot [M^+]_m \cdot V_S^2$$

Sie enthält außer dem gesuchten D_S^{-} nur noch Parameter, die entweder durch die Inkubationsbedingungen definiert sind $[D^-]_m, [M^+]_m$ oder im Experiment gemessen werden können: M_C^+, D_C^{-} . (Zur Bestimmung von V_S und V_T siehe nächsten Abschnitt)

Damit läßt sich die aufgenommene Menge an DMO-Anionen im Stromaraum und auch die Konzentration berechnen:

$$D_S^{-} = -\frac{a}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{a^2}{4}\right) - b}$$

$$V \cdot [D^-]_s = \frac{D_S^{-}}{V_S}$$

Die Menge an Methylamin-Kationen im Stromaraum ergibt sich nun einfach aus Gleichung I. :

$$M_S^+ = \frac{[D^-]_m \cdot [M^+]_m \cdot V_S^2}{D_S^{-}}$$

Zieht man M_S^+ von M_C^+ ab, so erhält man die Menge an Methylamin-Kationen M_T^+ im Thylakoidraum und durch Division mit V_T die Konzentration:

$$VI. \quad [M^+]_T = \frac{1}{V_T} \cdot \left(M_C^+ - \frac{[D^-]_m \cdot [M^+]_m \cdot V_S^2}{D_S^{-}} \right)$$

Aus den Konzentrationen der DMO^- Anionen im Stroma (Gleichung V) und der Methylamin-Kationen im Thylakoidraum (Gleichung VI) lassen sich nun die pH-Werte in den beiden Kompartimenten berechnen:

$$\text{pH}_S = \text{pH}_m + \log \frac{[\text{D}^-]_S}{[\text{D}^-]_m}$$

$$\text{pH}_T = \text{pH}_m + \log \frac{[\text{M}^+]_m}{[\text{M}^+]_T}$$

Entsprechend der quadratischen Gleichung liefert die Berechnung zwei Lösungen. In dem Beispiel in Tabelle 1 wurden beide Möglichkeiten durchgerechnet. Man bekommt einmal ein niedrigeres pH im Thylakoidraum als im Stroma, zum anderen den umgekehrten Fall. In früheren Experimenten mit "gebrochenen Chloroplasten" wurde gezeigt, daß während Belichtung Protonen in den Thylakoidraum transportiert werden, (Neumann und Jagendorf, 1964), d.h. das pH des Thylakoidraumes ist im Licht niedriger als im Dunkeln. Diese Bedingung wird durch die erste Lösung erfüllt. Die zweite Lösung, die eine Alkalisierung des Thylakoidraumes bei Belichtung anzeigen würde, kann als unreal verworfen werden. Das Stroma-pH ist auch auf eine weniger komplizierte Art zu berechnen. (Werdan et al., 1972), wenn man vereinfacht annimmt, daß alle DMO^- -Anionen des sorbitimpermeablen Chloroplastenraums sich im Stroma befinden. Hier hat man es dann nur mit zwei Kompartimenten, dem Medium und dem Chloroplasten-Stroma zu tun. Deshalb kann man auf die gleichzeitige Messung der Methylaminaufnahme verzichten. Da der Thylakoidraum verhältnismäßig klein ist und außerdem im Licht ein wesentlich niedrigeres pH als das Stroma besitzt, ist der auf Grund dieser Vereinfachung gemachte Fehler klein.

c) Abschätzung des relativen Anteils der Stroma- und Thylakoidräume am sorbitimpermeablen Chloroplastenraum

Während die Größe des sorbitimpermeablen Chloroplastenraumes mit der Silikonölfiltrationszentrifugation exakt bestimmt werden kann, ist es mit funktionellen Methoden nicht möglich, das Volumen des Stroma- und Thylakoidraumes zu messen. Wie im vorigen Abschnitt dargestellt wurde, ist die Größe dieser beiden Kompartimente jedoch zur pH-Bestimmung notwendig. Deshalb wurde eine Methode

angewandt, die es gestattet, die relativen Anteile dieser Räume am sorbitimpermeablen Chloroplastenraum zumindest abzuschätzen: Eine Chloroplastensuspension wurde für drei Minuten belichtet bzw. im Dunkeln stehengelassen, und anschließend mit Glutaraldehyd fixiert. Davon wurden elektronenmikroskopische Bilder mit 21 000 facher Vergrößerung hergestellt. Die Bilder wurden unter Transparenzpapier gelegt und die Konturen der Innenmembran und der Thylakoidstapel (Grana) nachgezeichnet. Die Chloroplasten wurden entlang der Innenmembran ausgeschnitten und gewogen. Man bekommt so das "Gesamt-volumen" des Stroma- und Thylakoidraumes, das sorbitimpermeable Chloroplastenvolumen. Auf dieselbe Weise wurde das "Grana-volumen" bestimmt und der Anteil des Thylakoidraumes an diesem Kompartiment abgeschätzt. Diese Abschätzung ist notwendig, da sich das "Granavolumen" aus dem Thylakoidraum und den ihn umgebenden Thylakoidmembranen zusammensetzt. Die Differenz "Gesamt-volumen-Thylakoidvolumen" ergibt schließlich das "Stromavolumen".

In Tabelle 2 sind die mit verschiedenen Chloroplastenpräparationen erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt. Der Thylakoidraum nimmt dabei etwa 10-14 % des Gesamtvolumens ein, wobei der Durchschnittswert bei belichteten Chloroplasten geringfügig über dem bei unbelichteten liegt.

Zur pH-Berechnung wurde der Thylakoidraum zu 12.5% des sorbitimpermeablen Chloroplastenraumes - erhalten als Durchschnittswert der drei Experimente - angenommen. Wie sich eine falsche Abschätzung des Thylakoidraumes auf die errechneten pH-Werte auswirken kann, wird im Abschnitt "Verlässlichkeit der Methode" diskutiert.

Während bei unseren Messungen Belichtung keinen Einfluß auf die Größe des sorbitimpermeablen Chloroplastenraumes hat (vgl. Legende Abb. 10) und auch den Anteil des Thylakoidraumes am Gesamtvolumen nicht wesentlich verändert (vgl. Tab.II), erbrachten frühere Untersuchungen ein Abflachen der Chloroplasten bei Belichtung (Itoh et al, 1963; Murakami u. Packer, 1970; Dilley et al, 1967; Sundquist u. Burris 1970; Miller u. Nobel, 1972; Hilgenheger u. Menke, 1965).

TABELLE 2

ABSCHÄTZUNG DER RELATIVEN GRÖßE DES THYLAKOIDGESAMTRAUMES IN CHLOROPLASTEN DURCH PLANIMETRIE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUFNAHMEN

(Experimentelle Details siehe Text)

Flächenanteil des innerhalb der Thylakoidmembranen gelegenen Raumes ("Thylakoidraum") an der Gesamtfläche des sorbitimpermablen Chloroplastenraumes. n=Zahl der ausgewogenen Chloroplasten.

Inkubationsbedingungen	Expt 1	Expt 2	Expt 3	$\bar{x}$ -Wert
Licht	0.130, n=21	0.128, n=15	0.132, n=6	0.130
Dunkel	0.118, n=26	0.103, n=23	0.139, n=6	0.125

d) Verlässlichkeit der Methode

In diesem Abschnitt sind Kontrollmessungen zusammengefaßt, die dazu dienen, die Brauchbarkeit der Methode zu demonstrieren.

1.) Abschätzung des Fehlers bei der pH-Bestimmung durch Abweichungen der tatsächlichen Größe des relativen Thylakoidraumes vom Mittelwert der Tabelle 2

Die pH-Berechnung basiert auf einem Durchschnittswert für den Thylakoidraum, wie er aus der Abschätzung in Tabelle 2 hervorgeht. Da dies eben nur eine Abschätzung ist, muß man damit rechnen, daß die tatsächliche Größe des Thylakoidkompartimentes von Chloroplasten einer Präparation unter Umständen nicht unerheblich von diesem Durchschnittswert abweicht. Tabelle 3 gibt ein Beispiel dafür, in welchem Ausmaß die pH-Bestimmung dadurch verfälscht werden kann.

TABELLE 3

BERECHNUNG DES pH IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM AUS DER AUFNAHME VON ^{14}C - DMO UND ^{14}C -METHYLAMIN

MÖGLICHE FEHLER DURCH ABWEICHUNGEN DER TATSÄCHLICHEN GRÖÖE DES RELATIVEN THYLAKOIDRAUMES VOM MITTELWERT DER TABELLE 2.

Anteil des Thylakoidvolumens am spezifischen Chloroplastenvolumen	pH Stroma- raum	pH Thylakoid- raum	ΔpH über die Thylakoid- Membran	Fehler
0.125 (gemessen)	7.87	5.61	2.26	
0.063 (angenommen)	7.84	5.33	2.51	+0.25
0.188 (angenommen)	7.91	5.78	2.13	-0.13

2.) Beeinflussung der pH-Messung durch geschädigte Chloroplasten
"Gebrochene Chloroplasten" bleiben während der Zentrifugation - bei Verwendung des geeigneten Silikonöls - auf der Ülschicht liegen und haben auf die Messung keinen Einfluß.

3.) Einfluß der eingesetzten Chlorophyllmenge auf die pH-Bestimmung
Tabelle 4 zeigt den Einfluß der eingesetzten Chlorophyllmenge auf die pH-Berechnung.

Unsere Experimente wurden mit Chlorophyllkonzentrationen von 20-60 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Innerhalb dieses Bereiches bleiben die Ergebnisse der pH-Messung durch unterschiedliche Chlorophyllkonzentrationen fast unbeeinflusst.

TABELLE 4

BERECHNUNG DES pH IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM AUS DER AUFNAHME VON DMO UND METHYLAMIN. TEMP. 4°
 ABHÄNGIGKEIT VON DER EINGESETZTEN CHLOROPHYLLKONZENTRATION.

Chloroplasten- konzentration (μg Chlorophyll/ ml)	sorbitimperme- abler Chloro- plastenraum ($\mu\text{l}/\text{mg}$ Chloro- phyll)	DMO-Konzen- tration im x Chloroplasten- raum (mM)	Methylamin- konzentration im x Chloroplasten- raum (mM)
13.0	31.8	1.50	0.553
26.6	33.5	1.62	0.586
57.3	33.8	1.71	0.607
92.0	30.4	1.76	0.689

pH-Stroma- raum	pH-Thylakoid- raum	ΔpH über die Thylakoidmembran
7.85	5.44	2.41
7.88	5.42	2.47
7.91	5.40	2.51
7.92	5.34	2.58

x = sorbitimpermeablen

4.) Einfluß der verwendeten DMO-Konzentration auf die pH-Bestimmung

Das Ergebnis einer pH-Messung ist für einen weiten Bereich unabhängig von der verwendeten DMO-Konzentration (Abb.6).

Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der DMO-Anionen-konzentration im Medium und im sorbitimpermeablen Chloroplasten-raum. Normalerweise wurden unsere Messungen mit 1mM DMO im Medium durchgeführt.

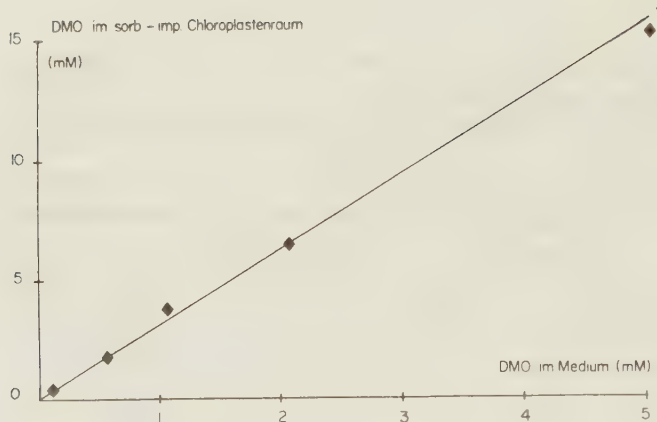


ABBILDUNG 6

DMO-ANIONENKONZENTRATIONEN IM SORBITIMPERMEABLEN CHLOROPLASTEN-RAUM ($26.3 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll) VON BELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN ($23.0 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DMO-ANIONEN-KONZENTRATION IM MEDIUM.

Experimentelle Einzelheiten siehe Abschnitt II. Temp. 4°C

5.) Einfluß der verwendeten Methylaminkonzentration auf die pH-Bestimmung

Mit Methylamin erhält man eine lineare Aufnahme nur mit Konzentrationen im Medium unter $60 \mu\text{M}$ (Abb.7). Mit höheren Konzentrationen macht sich der entkoppelnde Effekt dieser Substanz bemerkbar. Er führt zu leichten Veränderungen des Thylakoid-pH und damit des ΔpH über die Thylakoidmembran. (Tab. 5) Der Effekt höherer Methylaminkonzentrationen auf das Thylakoid-pH ist von Rottenberg et al., (1972) beschrieben worden. (siehe auch Abschnitt IVa), Um diese Komplikation zu vermeiden, wurden unsere Experimente mit $30 \mu\text{M}$ Methylamin durchgeführt.

Bei dieser Konzentration findet man weder eine Beeinflussung des Stroma- noch des Thylakoid-pH. Auch beobachtet man keinen Effekt auf CO_2 -Fixierung oder Photophosphorylierung. Dies trifft ebenfalls für DMO in dem verwendeten Konzentrationsbereich zu.

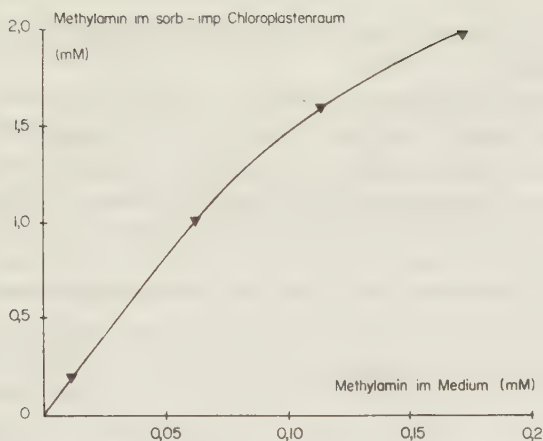


ABBILDUNG 7 - METHYLAMINKONZENTRATION IM SORBITIMPERMEABLEN CHLOROPLASTENRAUM ($24.5 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll) VON BELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN ($23.0 \mu\text{l}$ Chlorophyll/ml) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER METHYLAMINKONZENTRATION IM MEDIUM. Temp. 4°C
Experimentelle Einzelheiten siehe Abschnitt II.

TABELLE 5

ΔpH ÜBER DIE THYLAKOIDMEMBRAN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER METHYLAMIN-KONZENTRATION IM MEDIUM. TEMP. 4°C

Methylamin Medium (μM)	ΔpH über die Thylakoidmembran
---	---

10	2.84
60	2.75
110	2.61
1000	2.51

6.) Vergleich der pH-Messung mit DMO, CO₂/Bikarbonat, p-Nitrophenol und Methylamin

Tabelle 6 zeigt drei Experimente, in denen zur pH-Bestimmung drei verschiedene schwache Säuren - DMO, CO₂ / Bikarbonat und p-Nitrophenol - verwendet wurden. Mit DMO und Bikarbonat erhält man fast identische Ergebnisse, während die pH-Werte, die man mit p-Nitrophenol erhält, ein völlig anderes Bild geben.

TABELLE 6

BERECHNUNG DES STROMA-pH AUS DER AUFNAHME VON DMO, BIKARBONAT ODER p-NITROPHENOL IN DEN STROMARAUM

Expt. Nr.	Verwendete Substanz	Konzentration im Medium (mM)	Konzentration im sorbitim-permeablen Chloroplasten-raum (mM)	pH im Stroma berechnet
1	DMO	10	12.70	7.77
	HCO ₃ ⁻	10	11.09	7.70
	p-Nitrophenol	0.02	0.156	8.66
2	DMO	1	0.72	7.50
	HCO ₃ ⁻	10	7.61	7.53
3	DMO	1	1.40	7.82
	HCO ₃ ⁻	3.3	5.57	7.89

Die p-Nitrophenolaufnahme ist viel größer als die von DMO oder Bikarbonat, sie wird auch nicht durch Belichtung erhöht, wie das bei DMO oder Bikarbonat der Fall ist. (siehe Abschnitt IVa). Das CO₂/Bikarbonatsystem wurde von uns ebenfalls zur pH-Bestimmung verwendet (Werdan et al., 1972).

Die pH-Berechnung - basierend auf der Verteilung der geladenen Säure - bzw. Basenform - liefert dann falsche Ergebnisse, wenn die Substanz verstoffwechselt wird oder wenn sich die korrespondierende ungeladene Säure - bzw. Basenform in der Membranphase

anreichert. Das letztere ist wahrscheinlich bei p-Nitrophenol der Fall, das für pH-Stroma-Messung ungeeignet zu sein scheint. Für DMO ist gezeigt worden, daß es sich in Gewebehomogenaten nicht anreichert (Waddell u. Butler, 1959). Die Tatsache, daß man dieselben pH-Werte erhält, wenn man so verschiedene Verbindungen wie DMO und CO_2 /Bikarbonat verwendet, demonstriert die Verlässlichkeit der Methode. Auch mit Methylamin können fehlerhafte Ergebnisse durch Anreicherung der ungeladenen Basenform in der Membranphase ausgeschlossen werden. Dafür mögen die Daten der Tab. 1 als Beispiel dienen. Bei einem Medium-pH von 7.6 liegt nur 1% des Methylamins ($\text{pK} = 10.6$) in der undissoziierten Form vor. Schätzt man den Anteil der Membranphase am Chloroplastenvolumen zu ungefähr 5%, so findet man in der Membranphase hier nur 0,5 % des im Thylakoidraum akkumulierten Methylamins. Das würde die Ergebnisse der pH-Bestimmung aber praktisch nicht beeinflussen.

Der pH-Gradient über die Thylakoidmembran bricht im Dunkeln bei 20°C völlig zusammen (vgl. Abschnitt VI). Stroma- und Thylakoidraum können dann als einheitliches pH-Kompartiment aufgefaßt werden. Hier führt die Bestimmung des Chloroplasten-pH sowohl mit DMO als auch mit Methylamin zu dem gleichen Ergebnis (Tab. 7). Dieses Experiment zeigt, daß die Grundannahme der verwendeten Methode - die pH-abhängige Verteilung von Säureanionen bzw. Basenkationen - für die verwendeten Substanzen zutrifft.

TABELLE 7

BERECHNUNG DES CHLOROPLASTEN-pH AUS DER AUFNAHME VON DMO UND METHYLAMIN

INKUBATION BEI 20°C IM DUNKELN. pH IM MEDIUM = 7.2

Verwendete Substanz	Konzentration des Ions im Medium (μM)	Konzentration des Ions im sorbitimpermablen Chloroplastenraum(μM)	Anreicherungs-faktor Chloroplast/Medium	pH im Chloroplasten berechnet
DMO	868	268	0.31	6.69
Methylamin	30	90	3.00	6.72

IV. LICHTINDUZIERTER pH-VERÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOID- RAUM ISOLIERTER CHLOROPLASTEN

Mit "gebrochenen Chloroplasten" ließ sich zeigen, daß bei Belichtung Protonen aus dem Medium über die Thylakoidmembran transportiert werden (Neumann u. Jagendorf, 1964) und dies zu einer Abnahme des pH im Thylakoidraum führt (Deamer et al., 1967; Rumberg u. Siggel, 1969; Hager, 1969; Rottenberg et al., 1972;). Unsere Messungen sollten folgende Fragen klären:

- a) sind die mit "gebrochenen Chloroplasten" gefundenen Ergebnisse auf intakte Chloroplasten übertragbar?
- b) läßt sich die dabei zu erwartende Alkalisierung des Stroma-
raumes nachweisen?
- c) lassen sich die lichtinduzierten pH-Verschiebungen zwischen
den beiden Kompartimenten beeinflussen?

a) Kinetik der lichtinduzierten pH-Veränderungen im Stroma- und Thylakoidraum

Bei Belichten steigt das pH im Stroma an, während es im Thylakoid-
raum absinkt. Dieser Vorgang ist reversibel und läßt sich bei
niedriger Temperatur zeitlich gut auflösen. (Abb. 8).

Die Kinetik der pH-Veränderung ist in beiden Kompartimenten ver-
schieden, was durch die unterschiedlichen Pufferkapazitäten er-
klärt werden kann (siehe IV e). Im Experiment der Abb. 8 (ge-
messen bei 8°C) beträgt das Δ pH über die Thylakoidmembran im
Licht 2.2 pH-Einheiten, im Dunkeln 0.9 . Während sich bei höheren
Temperaturen (20°C) das Δ pH im Licht nicht verändert, sinkt es
im Dunkeln auf Null ab. Das relativ hohe Δ pH im Dunkeln scheint
für Chloroplasten, die bei niedriger Temperatur inkubiert werden,
charakteristisch zu sein.

Diese lichtinduzierten pH-Veränderungen erhält man auch bei wieder-
holtem Ein- und Ausschalten des Lichtes, ohne daß sich die Werte
wesentlich verändern (Abb. 9).

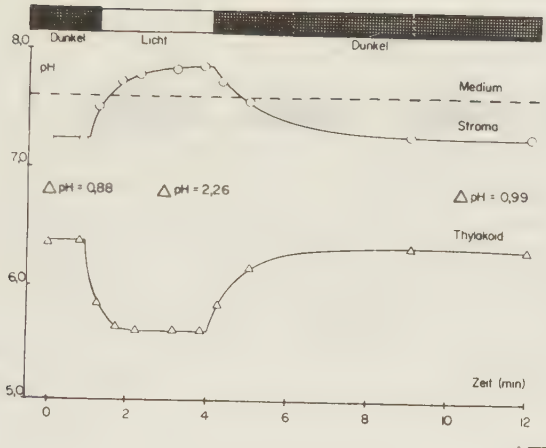


ABBILDUNG 8

pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN (45.0 μg Chlorophyll/ml), INDUZIERT DURCH DUNKEL-LICHT- UND LICHT-DUNKEL-WECHSEL.

Temp. 8°C. Sorbitimpermeabler Wasserraum 26.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll. Experimentelle Einzelheiten siehe Abschnitt II.

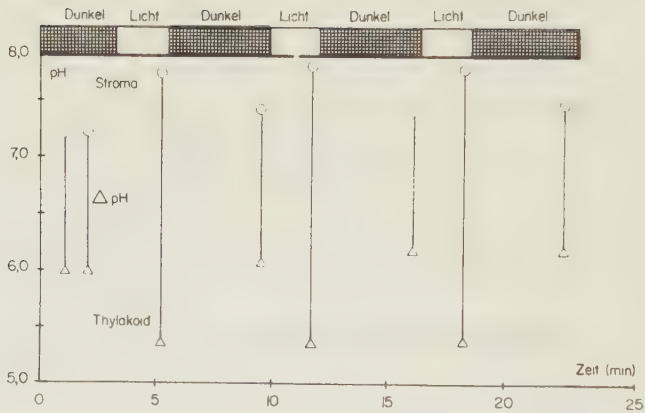


ABBILDUNG 9

pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN ($57.0 \mu\text{g Chlorophyll/ml}$), INDUZIERT DURCH WIEDERHOLTE DUNKEL-LICHT- und LICHT- DUNKEL - ÜBERGÄNGE.

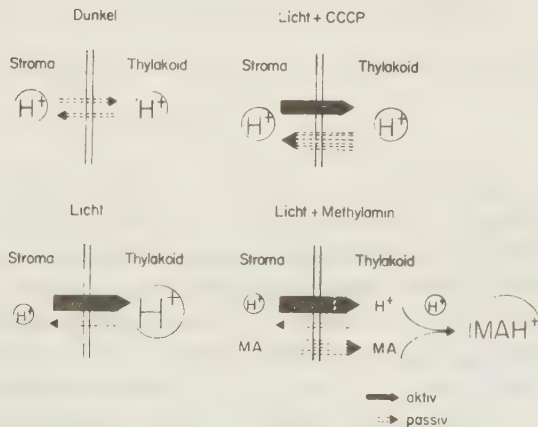
Experimentelle Details siehe Abschnitt II, Temp. 4°C . Sorbitim-permeabler Wasserraum:

Licht: $21.3 \mu\text{l/mg Chlorophyll}$, Dunkel: $21.9 \mu\text{l/mg Chlorophyll}$;

O = pH im Stroma; Δ = pH im Thylakoidraum;

b) Beeinflussung des pH-Gradienten über die Thylakoidmembran durch die Lichtintensität und durch verschiedene Entkoppler.

Abb. 10 zeigt das pH im Stroma- und Thylakoidraum sowie das ΔpH über die Thylakoidmembran in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Das ΔpH über die Thylakoidmembran kann auch durch Zugabe von Entkoppler zu belichteten Chloroplasten auf den Dunkelwert reduziert werden (Abb. 11-13), wobei das pH im Stroma unterschiedlich verändert wird: Während es mit CCCP bzw. Nigericin bereits bei niedrigen Entkopplerkonzentrationen stark abfällt, wird es durch Methylamin nicht wesentlich beeinflusst. Das läßt sich durch den verschiedenen Wirkungsmechanismus der einzelnen Entkoppler erklären: CCCP (ähnlich Nigericin) vermindert die Nettoaufnahme von Protonen aus dem Stroma- in den Thylakoidraum, indem es den passiven Rückstrom erhöht. Methylamin, das pH-abhängig im Thylakoidraum angereichert wird (siehe IIIa), puffert dort einen Teil der aufgenommenen Protonen ab.



SCHEMA DER ENTKOPPLERWIRKUNG VON CCCP UND METHYLAMIN

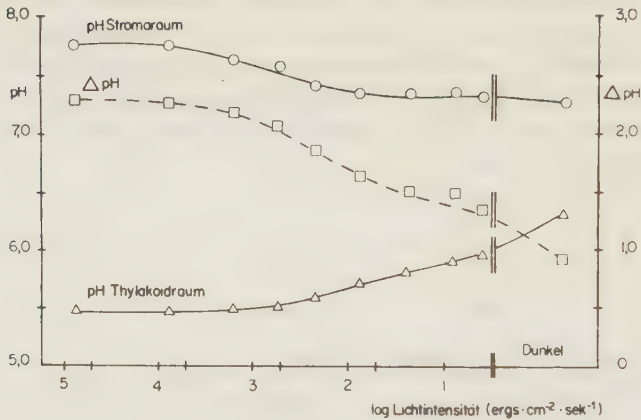


ABBILDUNG 10

ABHÄNGIGKEIT DER LICHTINDUZIERTEN pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN ($38 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) VON DER LICHTINTENSITÄT. Temp. 4°C . Der sorbitimpermeable Wasserraum ist unabhängig von der Lichtintensität:

Licht ($80000 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sek}^{-1}$): $24.6 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

Licht ($8000 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sek}^{-1}$): $24.1 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

Licht ($80 \text{ ergs} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sek}^{-1}$): $23.5 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

Dunkel: $24.3 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll. Weitere Details siehe Abschnitt II

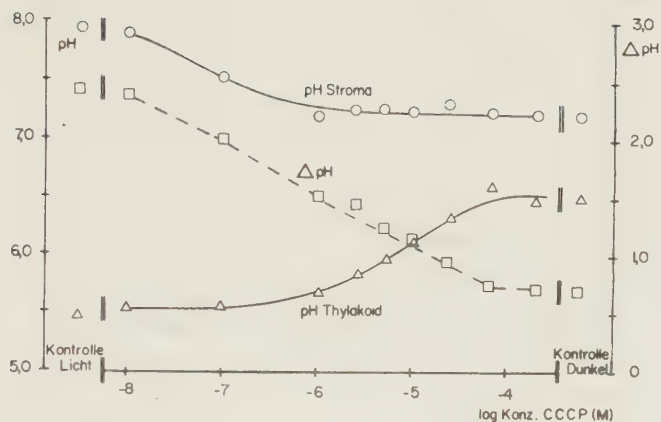


ABBILDUNG 11

EINFLUSS VON CCCP AUF DIE LICHTABHÄNGIGEN pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN (58 μg Chlorophyll/ml). Die Chloroplasten wurden 3 Minuten vorbelichtet, ehe CCCP zugegeben wurde. Inkubationszeit 2 Minuten, Temp. 4°C . Weitere Details siehe Abschnitt II.

CCCP hat auf den sorbitimpermeablen Wasserraum keinen Einfluß:

Licht: 19.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll

Licht und CCCP (0.1 μM): 20.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Licht und CCCP (1 μM) : 19.4 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Licht und CCCP (10 μM) : 19.1 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Licht und CCCP (200 μM) : 19.7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Dunkel: 19.8 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll.

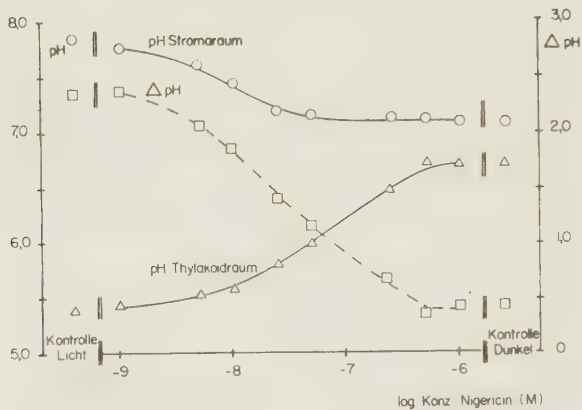


ABBILDUNG 12

EINFLUß VON NIGERICIN AUF DIE LICHTABHÄNGIGEN pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN (36 $\mu\text{gChlorophyll/ml}$). Die Chloroplasten wurden 3 Minuten vorbelichtet, ehe Nigericin zugegeben wurde. Inkubationszeit 2 Minuten, Temp. 4°C . Weitere Details siehe Abschnitt II. Das Medium ist K^{+} -frei. Das endogene Kalium (Nobel, 1969) der isolierten Chloroplasten scheint für den Nigericin-Effekt ausreichend zu sein. Nigericin hat auf den sorbitimpermeablen Wasserraum keinen Einfluß:

Licht: 23.4 $\mu\text{l/mg Chlorophyll}$;

Licht und Nigericin (0.01 μM) : 23.9 $\mu\text{l/mg Chlorophyll}$;

Licht und Nigericin (0.2 μM) : 24.4 $\mu\text{l/mg Chlorophyll}$;

Licht und Nigericin (1.0 μM) : 24.0 $\mu\text{l/mg Chlorophyll}$;

Dunkel: 23.9 $\mu\text{l/mg Chlorophyll}$.

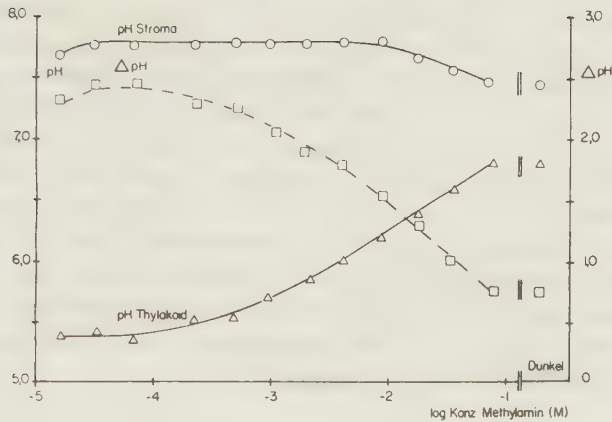


ABBILDUNG 13

EINFLUß VON METHYLAMIN AUF DIE LICHTABHÄNGIGEN pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN (52 μg Chlorophyll/ml). Die Chloroplasten wurden 3 Minuten vorbelichtet, ehe Methylamin zugegeben wurde. Inkubationszeit 2 Minuten, Temp. 4°C . Weitere Details siehe Abschnitt II. Methylamin hat auf den sorbit-impermeablen Wasserraum keinen Einfluß:

Licht: 30.9 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Licht und Methylamin (3mM) : 29.1 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Licht und Methylamin (48mM) : 29.7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;

Wie im Dunkeln bricht bei höherer Temperatur (20°C) der pH-Gradient über die Thylakoidmembran bei Zugabe von CCCP bzw. Methylamin fast völlig zusammen (Abschnitt VI).

c) Lichtinduzierter Protonentransport aus dem Stromaraum in das Medium

Zusätzlich zu dem Protonentransport vom Stroma- in den Thylakoidraum findet ein geringer lichtabhängiger Protonentransport aus dem Stromaraum über die Innenmembran in das umgebende Medium statt (Heber und Krause, 1971; Heldt et al., 1973). Wir haben gezeigt, daß etwa $0.018 \mu\text{mole Protonen/mg Chlorophyll}$ beim Ein- bzw. Ausschalten des Lichtes über die Innenmembran transportiert werden, während etwa 13 mal soviel Protonen ($0.24 \mu\text{mole/mg Chlorophyll}$) in den Thylakoidraum aufgenommen werden (Heldt et al., 1973). Deswegen läßt sich die lichtabhängige Alkalisierung des Stromaraumes größtenteils auf den Protonentransport über die Thylakoidmembran zurückführen. In allen pH-Berechnungen des Stroma- und Thylakoidraumes wurde diese Vereinfachung getroffen und eine "völlige Impermeabilität" der Innenmembran von belichteten Chloroplasten für Protonen vorausgesetzt.

d) Gezielte Beeinflussung des pH im Stroma

Verändert man das pH im Medium, so findet man - wenn auch in geringerem Maße - eine Änderung des pH im Stroma (Abb. 14). In dem gezeigten Experiment steigt das pH im Stroma um 0.86 Einheiten, während das pH im Medium um 1.41 Einheiten erhöht wird. Gleichzeitig ändert sich auch das pH im Thylakoidraum. Das ΔpH über die Thylakoidmembran bleibt jedoch fast gänzlich unbeeinflusst. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den mit "gebrochenen Chloroplasten" erhaltenen Daten von Rottenberg et al. (1972) überein.

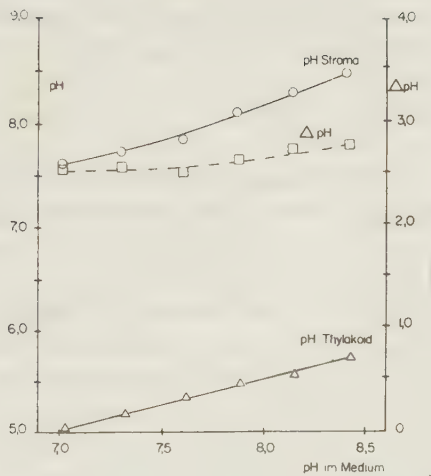


ABBILDUNG 14

ABHÄNGIGKEIT DES pH IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM VON BELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN (45 μg Chlorophyll/ml) VOM pH IM MEDIUM.

Experimentelle Einzelheiten siehe Abschnitt II. Der sorbitimpermeable Chloroplastenraum ist unabhängig vom pH im Medium:

pH 7.03 : 24.2 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

pH 7.32 : 24.9 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

pH 7.62 : 24.1 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

pH 7.89 : 25.6 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

pH 8.16 : 23.8 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

pH 8.43 : 25.8 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll;

Temp. 4°C

Eine Erniedrigung des pH im Stroma ist auch durch Zugabe von Azetat zum Medium zu erreichen. Wählt man die Azetatkonzentration genügend hoch, so sinkt das pH im Stroma bis auf den pH-Medium - Wert ab (Tab. 8). Diese pH-Senkung durch Azetat ist zu erwarten, wenn die Verbindung in der ungeladenen Form die Innenmembran passiert und im Stromaraum teilweise dissoziiert (vgl. Abschn. III a).

TABELLE 8

ERNIEDRIGUNG DES pH IM STROMARAUM VON BELICHTETEN SPINATCHLORO-
PLASTEN (85 μg Chlorophyll/ml) DURCH STEIGENDE AZETATKONZEN-
KONZENTRATIONEN

Azetat im Medium (mM)	pH Stroma	$\text{pH}_{\text{Stroma}} - \text{pH}_{\text{Medium}}$
-	7.36	0.36
10	7.31	0.31
20	7.21	0.21
40	6.98	-0.02

pH im Medium = 7.0; Temp. 20°C, sorbitimpermeabler Chloroplasten-
raum a) ohne Azetat: 25.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll;
b) mit 40 mM Azetat: 26.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll

Außerdem kann das Stroma-pH auch durch Zugabe der Entkoppler CCCP und Methylamin auf verschiedene Weise variiert werden (Abschnitt IVb). Von diesen Möglichkeiten wurde bei der Untersuchung der Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung vom Stroma-pH Gebrauch gemacht (Abschnitt VI).

e) Pufferkapazitäten des Stroma- und Thylakoidraumes

Bei Belichtung wandern Protonen aus dem Stroma- in den Thylakoidraum. Der dadurch entstehende pH-Gradient über die Thylakoidmembran bricht bei Verminderung der Lichtintensität bzw. durch Zugabe von Entkoppler teilweise zusammen (Abschnitt b). Dabei laufen die korrespondierenden pH-Änderungen in den beiden Räumen jedoch nicht parallel, d.h. der Transport einer bestimmten Menge von Protonen über die Thylakoidmembran verursacht eine unterschiedlich große Zu- bzw. Abnahme des pH im Stroma- bzw. Thylakoidraum. Dies läßt sich am einfachsten durch unterschiedliche Pufferkapazitäten in den beiden Kompartimenten erklären. Um diese Möglichkeit nachzuprüfen, wurden Protonenbewegungen mit einem Modell simuliert, das aus zwei Räumen besteht (Stroma-: Thylakoidraum = 7:1, vgl. Tab. II), die bestimmte Konzentrationen an anionischem Puffer - B_S , B_T - mit unterschiedlichen pK-Werten - pK_S , pK_T - enthalten. Schätzungen von Rottenberg et al. (1972) und Heldt et al. (1973) ergaben, daß bei Belichtung etwa 70 nmole Protonen pro μl Thylakoidraum aufgenommen werden. Die Pufferkapazität in diesem Kompartiment muß deswegen in derselben Größenordnung liegen. Aus den pH-Werten der beiden Räume im Dunkeln läßt sich das Verhältnis des dissoziierten und undissoziierten Anteils der beiden Puffer berechnen:

Stromaraum

$$\frac{[B^-]_S}{[HB]_S} = 10^{pH_S - pK_S}$$

$$[B]_S = [B^-]_S + [HB]_S$$

Thylakoidraum

$$\frac{[B^-]_T}{[HB]_T} = 10^{pH_T - pK_T}$$

$$[B]_T = [B^-]_T + [HB]_T$$

Nach Translokation einer bestimmten Menge an Protonen $[\Delta H^+]$ aus dem Stroma- in den Thylakoidraum können die resultierenden pH-Werte pH_S und pH_T mit folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$pH_S = pK_S + \log. \frac{[B^-]_S + [\Delta H^+]}{[HB]_S - [\Delta H^+]}$$

$$pH_T = pK_T + \log. \frac{[B^-]_T - 7[\Delta H^+]}{[HB]_T + 7[\Delta H^+]}$$

Das Modell wurde mit verschiedenen Werten für pK_S , pK_T und $[B]_S$ durchgerechnet.

Dabei ergab sich die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten der Abbildungen 10-12 für $pK_T = 5.5$, $pK_S = 6.8$ und $B_T/B_S = 4$. Diese Werte liegen der Abb. 15 zugrunde, in der die berechneten pH-Werte des Modells für beide Räume gegen das ΔpH aufgetragen sind (durchgezogene Linie). Außerdem sind die Meßwerte der Abb. 10-12 eingezeichnet. Es besteht eine gute Übereinstimmung der experimentell erhaltenen Daten (für die drei Experimente wurde das gleiche Pflanzenmaterial verwendet) mit den berechneten Werten.

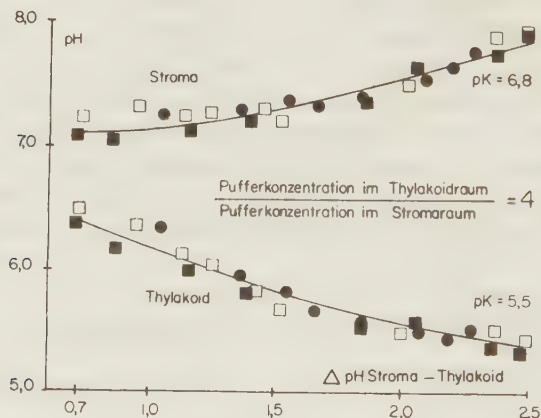


ABBILDUNG 15

pH-ÄNDERUNGEN IM STROMA- UND THYLAKOIDRAUM IN ABHÄNGIGKEIT VOM ΔpH ÜBER DIE THYLAKOIDMEMBRAN. Vergleich der berechneten pH-Änderungen in den beiden Räumen des im Text beschriebenen Modells (durchgezogene Linien) mit den experimentellen Daten der Abbildungen 10-12.

- Experiment mit Variation der Lichtintensität (Abb. 10)
- Experiment mit CCCP (Abb. 11)
- Experiment mit Nigericin (Abb. 12)

Der berechnete pK-Wert für den Thylakoidraum stimmt mit den Ergebnissen von Rottenberg et al., (1972) überein, wo mit "gebrochenen Chloroplasten" eine maximale Pufferkapazität um pH 5 gefunden wurde. Über die chemische Natur dieses Puffers ist nichts bekannt. Es wurde jedoch vermutet, daß die Pufferkapazität in den Thylakoiden auf Phospholipide in der Membran zurückzuführen ist (Kreutz, 1970). Die Pufferkapazität des Stromaraumes könnte auf anorganisches Phosphat und Phosphatester zurückzuführen sein, die in ausreichender Menge gefunden wurden (Urbach et al., 1965).

f) Zusammenfassung der Eigenschaften von Substanzen zur pH-Bestimmung und pH-Variation (siehe auch Tabelle 9)

1.) CCCP, Nigericin

Niedrige Konzentrationen von CCCP (0.1-1 μM) und Nigericin (0.01 μM) senken in belichteten Spinatchloroplasten das pH im Stromaraum auf den Dunkelwert. Da dabei das pH im Thylakoidraum nicht wesentlich verändert wird, bleibt der pH-Gradient über die Thylakoidmembran zum größten Teil noch erhalten. Höhere Konzentrationen (CCCP 50 μM , Nigericin 1 μM) erhöhen zusätzlich das pH im Thylakoidraum auf den Dunkelwert, wobei dann der pH-Gradient ebenfalls auf den Dunkelwert absinkt.

2.) Methylamin

Methylamin in niedriger Konzentration (30 μM) beeinflusst weder das pH im Stroma- noch im Thylakoidraum. Zusammen mit DMO ist es damit geeignet, das pH in diesen beiden Kompartimenten zu bestimmen.

Bei hohen Konzentrationen bricht der pH-Gradient über die Thylakoidmembran in belichteten Chloroplasten zusammen, ohne die lichtinduzierte Alkalisierung des Stroma-pH rückgängig zu machen.

TABELLE 9

VARIATION DES pH-GRADIENTEN ÜBER DIE INNENMEMBRAN UND DES

pH IM STROMA

Zusammenfassung von Ergebnissen aus Abb. 14, Tab. 8, Abb. 11, Abb. 13

	pH im Medium	pH im Stroma	pH im Thylakoid- raum	Δ pH Stroma- Thylakoidraum	Δ pH Stroma- Medium	
1.) Variation des pH im Medium (Abb. 14) im Licht, 40°C	7.03 7.32 7.62 7.89 8.16 8.43	7.62 7.73 7.82 8.09 8.29 8.47	5.09 5.14 5.30 5.44 5.53 5.70	2.53 2.59 2.52 2.65 2.76 2.77	0.59 0.41 0.20 0.20 0.13 0.04	
2.) Zugabe von Azetat (siehe Tab. 8), 20°C	7.00 7.00	7.36 6.98			0.36 -0.02	Licht Licht + 40mM Azetat
3.) Zugabe von CCCP (siehe Abb. 11) 40°C	7.60 7.60 7.60	7.94 7.20 7.24	5.50 5.70 6.60	2.44 1.50 0.64	0.34 -0.40 -0.36	Licht Licht + 1 μ M CCCP Licht + 50 μ M CCCP
4.) Zugabe von Methylamin (siehe Abb. 13) 40°C	7.60 7.60 7.60	7.73 7.80 7.57	5.40 6.22 6.80	2.33 1.58 0.77	0.13 0.20 -0.03	Licht Licht + 5mM Methyl Licht + 50mM amin

3.) DMO

DMO ist zusammen mit Methylamin geeignet, das pH im Stroma- und Thylakoidraum zu bestimmen. Bei alleiniger Verwendung kann mit dieser Substanz das Stroma-pH ermittelt werden. Aus meßtechnischen Gründen ist es dazu besonders dann geeignet, wenn das pH im Stroma alkalischer als im Medium ist.

4.) Variation des pH im Medium

Variation des pH im Medium führt zu einer gezielten Veränderung des Stroma-pH, ohne den pH-Gradienten über die Thylakoidmembran zu verändern.

5.) Azetat

Durch Zugabe steigender Mengen an Azetat zu belichteten Chloroplasten läßt sich das Stroma-pH sukzessive bis auf das Medium-pH erniedrigen.

V. EINFLUSS DES pH-GRADIENTEN ÜBER DIE INNENMEMBRAN AUF DIE METABOLITAUFNAHME IN CHLOROPLASTEN

Bei unseren Untersuchungen über die Metabolitaufnahme in Chloroplasten stellte sich heraus, daß die Transportgeschwindigkeit einiger Substanzen vom pH-Gradienten über die Innenmembran abhängig war. Durch die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromaraumes gewinnt dieser Befund auch physiologische Bedeutung. Die meisten Ergebnisse über den Metabolittransport zwischen Cytoplasma (bzw. Medium) und Chloroplast sind bisher mit indirekten Methoden gewonnen worden (Zusammenfassung siehe Walker, i.Dr.; Heber 1974). Direkt gemessen wurde lediglich der Transport von Substanzen, die über den Dicarboxylat-, Phosphat- und Adeninnukleotidcarrier laufen (Heldt 1969; Heldt u. Rapley, 1970). Deswegen möchte ich in diesem Abschnitt nicht nur die Bedeutung des pH-Gradienten für Transportvorgänge an der Innenmembran erläutern, sondern ganz allgemein aufzeigen, was unsere direkten Messungen zum Verständnis des Metabolittransportes zwischen Cytoplasma und Chloroplasten beitragen können.

Das pH im Stroma wurde entweder durch das pH im Medium, durch Licht-Dunkel Änderungen oder durch Zugabe von CCCP in niedrigen Konzentrationen variiert.

a) Transport von Metaboliten, die über den Phosphatcarrier aufgenommen werden

Der kürzlich beschriebene Phosphatcarrier (Heldt u. Rapley 1970; Werdan u. Heldt, 1972; Heldt et al., 1974) - lokalisiert in der Innenmembran - nimmt im Metabolittransport zwischen Cytoplasma und Chloroplast eine zentrale Bedeutung ein. Er transportiert im Gegentauch 3-Phosphoglyzerinsäure, anorganisches Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Damit ist er in der Lage, den Chloroplasten mit dem für die CO_2 -Fixierung notwendigen anorganischen Phosphat zu versorgen und die dabei entstehenden Reaktionsprodukte - vor allem Dihydroxyacetonphosphat - ins Cytoplasma auszuschleusen. Der Phosphatcarrier ermöglicht außerdem einen indirekten Transport der bei der Photophosphorylierung gebildeten Energie - und Reduktionsäquivalente aus dem Chloroplasten ins Cytoplasma. Dieser Vorgang könnte auch physiologische Bedeutung besitzen, da der Adeninnukleotidcarrier nur eine sehr niedrige Transportkapazität besitzt (Heldt, 1969).

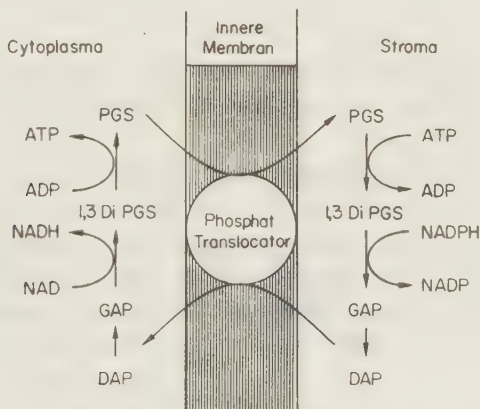


ABBILDUNG 16

INDIREKTER TRANSPORT VON ATP UND REDUKTIONSÄQUIVALENTEN ÜBER DEN PHOSPHATCARRIER AUS DEM CHLOROPLASTENSTROMA IN DAS CYTOPLASMA (aus Heldt et al., 1972)

Abb. 17 zeigt eine Kinetik der Aufnahme von radioaktiv markiertem 3-Phosphoglyzerat aus dem Medium in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum. Da die Kinetiken wegen der hohen Aktivität dieses Carriers nur bei niedrigen Temperaturen auflösbar sind, wurden alle Experimente bei 4°C durchgeführt.

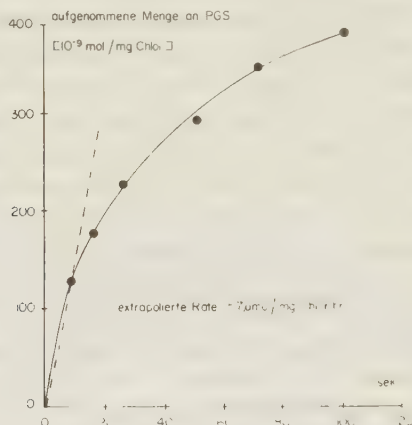


ABBILDUNG 17

KINETIK DER PGS-AUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSER-
RAUM (18.6 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll) VON BELICHTETEN SPINATCHLORO-
PLASTEN (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Temp. 4°C, PGS - Konzentration im Medium: 1mM

Wie die Abbildung zeigt, kann man aus dem ersten Meßpunkt (8 sec.-Wert) mit hinreichender Genauigkeit die Transportrate berechnen. Alle im weiteren Verlauf angegebenen Transportaktivitäten wurden mit solchen 8-Sekunden-Messungen ermittelt.

TABELLE 10

TRANSPORT VON PGS UND ANORGANISCHEM PHOSPHAT IN DEN SORBIT-IMPERMEABLEN WASSERRAUM (16.0 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll) VON SPINAT-CHLOROPLASTEN (100 μg Chlorophyll/ml). HEMMUNG DURCH p-CHLORO-MERCURIPHENYLSULFONSÄURE (CMS). DIE CHLOROPLASTEN WURDEN 5 MINUTEN MIT DEM HEMMSTOFF PRÄINKUBIERT.

	Transportrate ($\mu\text{Mole}/\text{mg}$ Chlorophyll $\cdot$ h)	
	PGS (1mM)	Pa (1mM)
ohne Hemmstoff	58.7	40.4
CMS (50 μM)	4.7	0.8
% Hemmung	92	98

Der Phosphatcarrier kann durch Substanzen, die mit SH-Gruppen reagieren, nahezu vollständig gehemmt werden (Tabelle 10). Daraus könnte man auf SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Carriers schließen. Auch der Phosphatcarrier in Mitochondrien ist durch SH-Reagentien hemmbar (Fonyo, 1968; Tyler, 1968). Die Hemmung durch CMS ist relativ spezifisch, da die Aufnahme von Substraten des Dicarboxylat-Translokators - z.B. Glutamat - bedeutend weniger vermindert wird (Abb. 18).

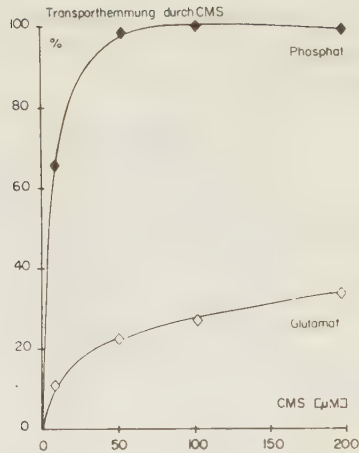


ABBILDUNG 18

HEMMUNG DES TRANSPORTS VON ANORGANISCHEM PHOSPHAT (Pa) 1mM UND GLUTAMAT 1mM IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM (18.0 μ l/mg Chlorophyll) VON UNBELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN (100 μ g Chlorophyll/ml) DURCH p-CHLROMERCURIPHENYLSULFONSÄURE (CMS). Temp. 4°C. Die Chloroplasten wurden 5 Min. mit CMS präinkubiert. Die Transportrate ohne Zusatz von CMS beträgt für Phosphat 21.9 und für Glutamat 28.1 μ mole/mg Chlorophyll $\cdot$ h.

Bestimmt man die Raten der Phosphat- und Phosphoglyzerataufnahme im Licht und Dunkel (Tab. 11), so stellt man fest, daß der Transport von Phosphat durch Belichtung nicht beeinflußt wird, während der von PGS stark ansteigt.

Kleine Konzentrationen des Entkopplers m-Chlor-Carbonylcyanid-phenylhydrazon hemmen diese lichtabhängige Mehraufnahme völlig, sie haben jedoch auf die Transportrate von Phosphat und Phosphoglyzerat im Dunkeln keinen Einfluß.

TABELLE 11

TRANSPORT VON PGS UND ANORGANISCHEM PHOSPHAT IN DEN SORBIT-IMPERMEABLEN WASSERRAUM ($22.3 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll) VON SPINAT-CHLOROPLASTEN ($108 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) IM LICHT UND DUNKEL. EINFLUSS DES ENTKOPPLERS m-CHLOR-CARBONYLCYANIDPHENYLHYDRAZON (CCCP). TEMP. 4°C .

	Transportrate ($\mu\text{Mole/mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$)	
	PGS (1mM)	Pa (1mM)
Dunkel	24.3	28.4
Dunkel + CCP (1 μM)	22.4	29.0
Licht	40.6	26.5
Licht + CCP (1 μM)	24.4	27.8

Der lichtinduzierte PGS-Mehrtransport ist abhängig von der Dauer der Vorbelichtung der Chloroplasten (Abb. 19). Bis zur maximalen Aktivierung der PGS-Aufnahme müssen die Chloroplasten etwa 2 Minuten vorbelichtet werden. So lange dauert es bei dieser Temperatur auch, bis die lichtabhängige Alkalisierung des Stroma-
raumes abgeschlossen ist. (vgl. Abb. 8)

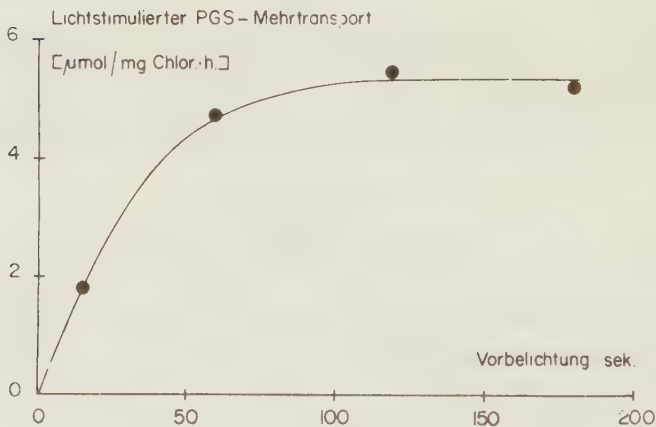


ABBILDUNG 19

LICHTSTIMULIERTER PGS-MEHRTRANSPORT IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM (26.7 μ l/mg Chlorophyll) VON SPINATCHLOROPLASTEN (166 μ g Chlorophyll/ml) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORBELICHTUNG. Temp. 4°C, PGS-Konzentration im Medium: 1mM. Die Transportrate im Dunkeln (15.8 μ mol/mg Chlorophyll · h) wurde von der Transportrate im Licht vor der Auftragung subtrahiert.

TABELLE 12

TRANSPORT VON PGS UND ANORGANISCHEM PHOSPHAT IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM ($18.6 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll) VON SPINAT-CHLOROPLASTEN ($95 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml). ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM MEDIUM. TEMP. 4°C , DUNKEL

pH im Medium	Transportrate ($\mu\text{Mole/mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$)	
	PGS (0.5mM)	Pa (0.5mM)
8.2	10.5	19.7
7.6	14.6	17.0
7.0	16.6	16.1

Tabelle 12 zeigt die Aufnahme von PGS und anorganischem Phosphat in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum bei verschiedenem Medium-pH. Die PGS-Transportrate steigt mit wachsender Protonenkonzentration im Medium an, während man für Phosphat eine geringere Abhängigkeit in umgekehrter Richtung findet. Da mit fallendem pH im Medium der pH-Gradient über die Innenmembran größer wird (vgl. Tabelle 9), bedeutet eine Steigerung des pH-Gradienten eine Erhöhung des PGS-Transportes. Berücksichtigt man einmal die Tatsache, daß der Phosphatcarrier im Gegentausch arbeitet, zum anderen, daß bei physiologischem pH Phosphoglyzerat dreifach negativ, Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat zweifach negativ geladen ist, so bietet sich für den Mehrtransport von PGS folgende Erklärungsmöglichkeit an (Abb. 20):

Aus Gründen der Elektroneutralität muß mit jedem Phosphoglyzeratmolekül, das aus dem Medium in den Chloroplasten gegen endogenes Phosphat oder Dihydroxyacetonphosphat transportiert wird, zusätzlich ein Proton aufgenommen werden. Dieser Cotransport wird durch einen hohen pH-Gradienten über die Innenmembran ($\Delta pH = pH \text{ Stroma} - pH \text{ Medium}$) begünstigt. Das würde erklären, warum die PGS-Transportrate sowohl durch Erniedrigung des pH im Medium als auch durch Erhöhung des pH im Stroma (Belichtung) stimuliert wird. Auch der CCCP-Effekt ist nur über die pH-Erniedrigung, nicht über die entkoppelnde Wirkung zu verstehen, da der Phosphatcarrier energieunabhängig arbeitet (vgl. Tabelle 11).

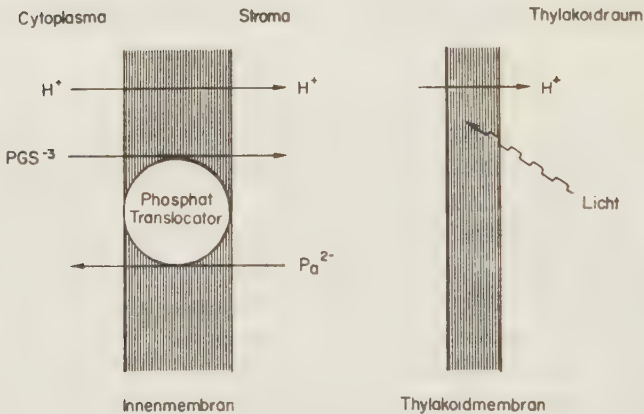


ABBILDUNG 20

SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VORGESCHLAGENEN HYPOTHESE ZUR ERKLÄRUNG DER PGS-MEHRAUFNAHME IM LICHT.

Wie Abb. 21 zeigt, ist die Michaeliskonstante K_M des PGS - Transports im Licht und Dunkel gleich, während die maximale Transportrate $V_{\max}$ bei Belichtung erhöht wird, was in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Hypothese stehen würde. Die Bedeutung, die dem pH-Gradienten über die Innenmembran beim indirekten Energietransport via Phosphatcarrier zukommt, wird in Abschnitt VIIb diskutiert.

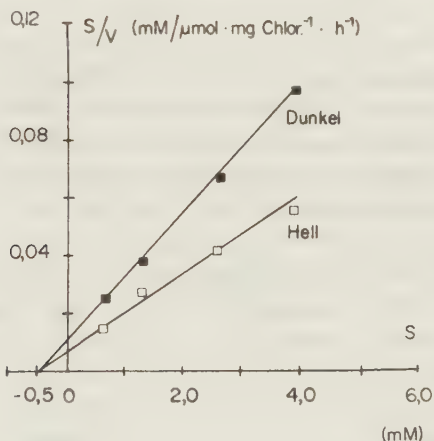


ABBILDUNG 21

KONZENTRATIONSSABHÄNGIGKEIT DER 3-PHOSPHOGLYZERATAUFNAHME IM LICHT UND IM DUNKEL. Temp. 4°C ; sorbitimpermeabler Chloroplastenraum: $22.5 \mu\text{l/mg Chlorophyll}$; $70 \mu\text{g Chlorophyll/ml}$.

$$K_M \text{ Hell} = K_M \text{ Dunkel} = 0.45 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \text{ Dunkel} = 40 \mu\text{mole/mg Chlorophyll} \times h$$

$$V_{\max} \text{ Hell} = 67 \mu\text{mole/mg Chlorophyll} \times h$$

b) Aufnahme von Aminosäuren in Chloroplasten

Bei dieser Substanzklasse liegen bisher nur sehr wenige direkte Messungen vor (Gimmler et al., 1974). Auf Grund der Verteilung von radioaktiv markierten Aminosäuren zwischen Cytoplasma und Chloroplasten wurde ein schneller Transport besonders von Glyzin und Serin angenommen (Übersicht siehe Walker, i. Dr.). Allerdings läßt sich bei dieser indirekten Methode eine metabolische Umwandlung auf der einen Seite der Innenmembran und eine anschließende Rückverwandlung auf der anderen Seite nicht ausschließen. Auf Grund osmotischer Messungen postulieren Nobel und Cheung (1972) zwei Carrier für Aminosäuren: einen für Glyzin, Alanin, Leucin, Isoleucin und Valin, den anderen für Serin, Threonin und Methionin.

TABELLE 13

RATEN DER AMINOSÄUREN-AUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSER-
RAUM VON UNBELICHTETEN SPINATCHCHLOROPLASTEN. TEMP. 20°, KONZENTRA-
TION DER AMINOSÄUREN IM MEDIUM: 1mM. MITTELWERTE AUS ZWEI EX-
PERIMENTEN. IN JEDEM EINZELEXPERIMENT WURDEN DIE AUFNAHMERATEN
ALLER AMINOSÄUREN GEMESSEN.

Aminosäure	Meßzeit sec	Aufnahmerate in nmole/mg Chl. x Meßzeit	Aufnahmerate in μ mole/mg Chl. x h	relative Aufnahme- rate
Glyzin	45	12.1	0.97	1.70
Alanin	90	15.5	0.62	1.09
Leucin	10	4.4	1.59	2.79
Isoleucin	10	9.6	3.44	6.04
Phenylalanin	10	10.7	3.84	6.74
Prolin	60	9.5	0.57	1.00
Serin	60	9.7	0.58	1.02
Threonin	120	19.7	0.59	1.04
Lysin	10	14.0	5.04	8.84
Arginin	10	22.1	7.96	13.96
Histidin	10	9.9	3.57	6.26

Unsere eigenen Untersuchungen wurden nach demselben Prinzip durchgeführt, wie es für die Messung der Phosphoglyzerataufnahme beschrieben wurde (vgl. Abb. 17). Die Aufnahmekinetik ist für alle untersuchten Aminosäuren bei 20°C gut auflösbar. Da die Transportgeschwindigkeiten jedoch unterschiedlich sind, wurden aus meßtechnischen Gründen zur Bestimmung der Raten unterschiedliche Zeiten verwendet (Tabelle 13).

Die niedrigsten Raten wurden für Prolin, Serin, Threonin, Alanin und Glyzin gefunden, während die apolaren Aminosäuren mit längerer Kohlenstoffkette (Leucin, Isoleucin) und die mit aromatischem Ring (Phenylalanin, Tyrosin) schneller aufgenommen werden. Erstaunlich sind die hohen Transportgeschwindigkeiten der positiv geladenen Verbindungen Arginin und Lysin.

Asparaginsäure und Glutaminsäure wurden in diese Untersuchungen nicht mit einbezogen, da sie über den Dicarboxylatcarrier in den Chloroplasten gelangen (Heldt, H.W. und Rapley, 1970; Lehner und Heldt, 1973; Heldt et al., 1974).

Für fast alle untersuchten Aminosäuren besteht eine nahezu lineare Abhängigkeit der Aufnahmerate von der vorgegebenen Konzentration im Medium in dem untersuchten Bereich von 0.1-8.0 mM (Tabelle 14). Lediglich Lysin und Arginin zeigen ein sättigungsähnliches Verhalten, auf das später noch eingegangen wird. In Tabelle 15 wurde die Aufnahme nach 5 und 10 Minuten gemessen. Im sorbitimpermeablen Chloroplastenraum stellt sich eine Konzentration ein, die sowohl im Licht als auch im Dunkeln etwa der Außenkonzentration entspricht. Es findet also keine wesentliche Metabolisierung der Aminosäuren im Chloroplastenstroma statt. Nur bei Lysin und Arginin ist die aufgenommene Menge im Dunkeln höher wie im Licht.

TABELLE 14

GESCHWINDIGKEIT DER AMINOSÄUREAUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM VON UNBELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION IM MEDIUM. ANGABEN IN $\mu\text{mole/mg Chl.} \cdot \text{h}$ (1.Zeile) UND $\mu\text{mole/mg Chl.} \cdot \text{h} \cdot \text{KONZENTRATION IM MEDIUM}$ (2.Zeile) TEMP. 20°C. MEßZEITEN SIEHE TABELLE 13

Mittelwerte aus zwei Experimenten. In jedem Einzelexperiment wurden die Aufnahmeraten aller Aminosäuren gemessen.

Aminosäure	Konzentration im Medium in mM			
	0.12	0.25	1.0	8.0
Glyzin	0.10	0.29	0.97	7.04
	0.81	1.17	0.97	0.88
Alanin	0.08	0.13	0.62	4.80
	0.64	0.53	0.62	0.60
Leucin	0.33	0.67	1.59	9.92
	2.78	2.68	1.59	1.24
Isoleucin	0.37	0.71	3.44	8.32
	3.05	2.84	3.44	1.04
Phenylalanin	0.56	1.16	3.84	22.48
	4.64	4.63	3.84	2.81
Prolin	0.06	0.15	0.57	5.60
	0.50	0.58	0.57	0.70
Serin	0.10	0.16	0.58	4.88
	0.82	0.63	0.58	0.61
Threonin	0.06	0.12	0.59	4.40
	0.52	0.47	0.59	0.55
Lysin	1.03	1.65	5.04	38.72
	8.59	6.58	5.04	4.84
Arginin	2.05	3.38	7.96	42.00
	17.10	13.50	7.96	5.25
Histidin	0.40	0.66	3.57	25.04
	3.34	2.64	3.57	3.13

TABELLE 15

AMINOSÄUREAUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM VON SPINATCHLOROPLASTEN. MESSUNG DER KONZENTRATIONEN IM CHLOROPLASTEN 5 UND 10 MINUTEN IM LICHT UND IM DUNKELN, KONZENTRATION DER AMINOSÄUREN IM MEDIUM = 1mM; TEMP. 20°C.

Mittelwerte aus zwei Experimenten. In jedem Einzelexperiment wurden die Aufnahmeraten aller Aminosäuren gemessen.

Aminosäuren	Konzentration im Chloroplasten (mM)			
	Licht		Dunkel	
	5 Min.	10 Min.	5 Min.	10 Min.

Glyzin	1.10	1.37	1.15	1.01
Alanin	0.66	0.62	0.54	0.58
Leucin	0.67	0.70	0.72	0.75
Isoleucin	0.69	0.65	0.72	0.69
Phenylalanin	0.93	0.92	0.83	0.87
Prolin	0.66	0.60	0.55	0.54
Serin	0.62	0.72	0.54	0.60
Threonin	0.59	0.60	0.55	0.58
Lysin	0.81	0.93	3.02	2.63
Arginin	1.12	1.10	3.09	3.14
Histidin	0.71	0.76	0.72	0.66

Die Ergebnisse der Tabellen 13-15 sprechen dafür, daß die untersuchten Aminosäuren mit Ausnahme von Lysin und Arginin via Diffusion die Innenmembran permeieren, und zwar unabhängig vom pH-Gradienten zwischen Medium und Stroma, da sich im Licht und Dunkel im Chloroplasten die gleichen Konzentrationen einstellen. Eine solche pH-Abhängigkeit ist auch nicht zu erwarten da die Aminosäuren bei pH 7-8 zum größten Teil in der Zwitterionenstruktur vorliegen, also weder als schwache Säuren noch als Basen reagieren können. Das Verhalten von Lysin und Arginin - sowohl bei der Konzentrationsabhängigkeit, als auch die unterschiedliche Gleichgewichtseinstellung im Licht und im Dunkeln - könnte durch die zweite positive Ladung erklärt werden. Sie würden sich damit wie schwache Basen verhalten.

Allerdings müßte man zusätzlich fordern, daß die Thylakoidmembran für diese beiden Aminosäuren impermeabel ist.

Die Aufnahme der Aminosäuren kann also für Konzentrationen im Medium bis etwa 10mM durch folgende einfache Formel beschrieben werden:

$$V = K \cdot (AS_M - AS_S)$$

V = Aufnahme rate in $\mu\text{mole/mg Chlorophyll} \cdot h$

K = Aufnahme rate bei einer Konzentrationsdifferenz zwischen Medium und Chloroplast von 1mM (vgl. Tab.14) in $\mu\text{mole/mg Chlorophyll} \cdot h \cdot \text{mM}$

AS_M , AS_S = Konzentration der Aminosäure im Medium bzw. Stroma. Bei der Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Transportraten wurde mit Konzentrationen gearbeitet (0.1-8mM), wie sie auch in vivo im Cytoplasma und in Chloroplasten vorliegen (Aach und Heber, 1967).

Dies muß berücksichtigt werden, wenn man unsere Experimente - die als Aufnahmemechanismus eine Diffusion durch die Innenmembran wahrscheinlich machen - mit denen von Nobel und Cheung vergleichen will. In deren Experimenten - die zu dem Postulat von zwei Aminosäurecarriern führten - betrug die eingesetzte Konzentration der Aminosäuren bis zu 250mM. Die gemessenen K_M -Werte liegen um 100mM. Unsere Messungen schließen einen aktiven Transport mit so hohen K_M -Werten nicht aus. Zudem spielt diese Unterscheidung bei der Betrachtung von Transportraten in vivo sowieso keine Rolle, da diese auf jeden Fall bei physiologischen Konzentrationen eine lineare Abhängigkeit zeigen.

c) Aufnahme von Kohlendioxid in Chloroplasten

Mit einer guten Chloroplastenpräparation erhält man CO_2 -Fixierungsraten von 50-150 $\mu\text{mole/mg Chl.} \cdot \text{h}$, etwa vergleichbar mit der Photosyntheserate ganzer Blätter. Das bedeutet aber auch, daß 50-150 $\mu\text{mole CO}_2/\text{mg Chl.} \cdot \text{h}$ aus dem umgebenden Medium in das Stroma aufgenommen werden müssen. Mit den in diesem Abschnitt geschilderten Experimenten versuchten wir herauszufinden, auf welche Weise das Kohlendioxid die Innenmembran passiert und in welcher Form der anorganische Kohlenstoff im Chloroplastenstroma vorliegt.

1.) Aufnahme von CO_2 /Bikarbonat in das Chloroplastenstroma.

Die Experimente, in denen die Aufnahme von radioaktiv markiertem Bikarbonat in die Chloroplasten gemessen wurde, unterscheiden sich methodisch etwas von den bisher beschriebenen Experimenten. Gibt man zu belichteten Chloroplasten ^{14}C -Bikarbonat, so werden diese einen Teil des aufgenommenen CO_2 /Bikarbonat via Calvin-Zyklus in organische Verbindungen überführen. Während wir bei den Messungen der vorigen Abschnitte davon ausgingen, daß die in den Chloroplasten gefundene Radioaktivität proportional der aufgenommenen Menge der markierten Verbindung ist, so müssen wir bei den folgenden Messungen berücksichtigen, daß der im sorbit-impermeablen Wasserraum gefundene ^{14}C -Kohlenstoff entweder Bikarbonat/ CO_2 darstellt - dessen Aufnahme gemessen werden soll - oder aber in organischen Verbindungen fixierter Kohlenstoff. In den folgenden Experimenten (Abb. 22 und 23) - welche die Kinetik der Bikarbonataufnahme in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum im Licht und Dunkel zeigen - soll auf diese Besonderheit etwas näher eingegangen werden: Radioaktiv markiertes Bikarbonat wurde zu einer belichteten Chloroplastensuspension gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Inkubation dadurch beendet, daß die Chloroplasten durch die Silikonschicht zentrifugiert und durch Natronlauge, die sich zuunterst im Polypropylen-Röhrchen befindet, denaturiert wurden. Die Bikarbonataufnahme wurde über die Gesamtradioaktivität in der Sedimentfraktion berechnet (Abb. 22A). Zur Bestimmung des in organischen Substanzen eingebauten Kohlenstoffs wurde ein Teil der Sedimentfraktion mit Salzsäure behandelt, um das vorhandene CO_2 /Bikarbonat auszutreiben.

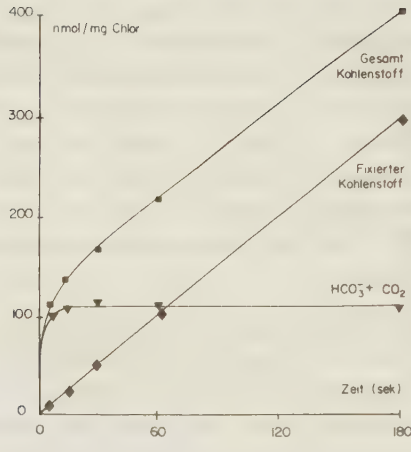


ABBILDUNG 22A

KINETIK DER CO₂/BIKARBONATAUFNAHME IN CHLOROPLASTEN.

Bestimmung des anorganischen und organisch fixierten Kohlenstoffs im sorbitimpermeablen Wasserraum (50.1 μ l/mg Chlorophyll) von belichteten Spinachchloroplasten (28 μ g Chlorophyll/ml). Temp. 9°C
 Bikarbonat-Konzentration im Medium: 0.5 mM.

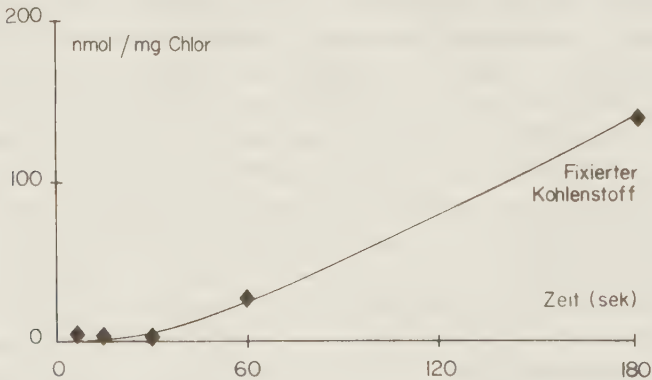


ABBILDUNG 22B

BESTIMMUNG DES ORGANISCH FIXIERTEN KOHLENSTOFFS IM MEDIUM

(Überstand der belichteten Chloroplastensuspension der Abb. 22A)

Die Menge anorganischen Kohlenstoffs (CO_2 /Bikarbonat) wird aus der Differenz der Gesamt-Bikarbonataufnahme und dem in organischen Substanzen eingebauten Kohlenstoff berechnet. Außerdem wurde der im Medium auftretende, organisch fixierte Kohlenstoff auf die gleiche Weise wie im Sediment bestimmt. (Abb. 22B).

Die CO_2 -Fixierungsrate wurde aus dem im Zeitraum zwischen 3 und 5 Minuten im Überstand und Sediment erscheinenden fixierten Kohlenstoff berechnet. Sie betrug $15.1 \mu\text{mole/mg Chlorophyll} \cdot \text{Stunde}$ bei einer Temperatur von 9°C .

Abb. 23 zeigt das gleiche Experiment - mit derselben Chloroplastenpräparation - ausgeführt im Dunkeln. Dabei findet kein Einbau von radioaktiv markiertem Kohlenstoff in organische Verbindungen statt, in den Chloroplasten findet sich somit im Dunkeln nur radioaktives CO_2 /Bikarbonat. In beiden Experimenten ging die CO_2 /Bikarbonataufnahme so schnell, daß sie zeitlich nicht aufgelöst werden konnte. Sowohl im Licht als auch im Dunkeln ist die Nettoaufnahme von CO_2 /Bikarbonat in den sorbitimpermablen Chloroplastenraum in weniger als 10 Sekunden beendet.

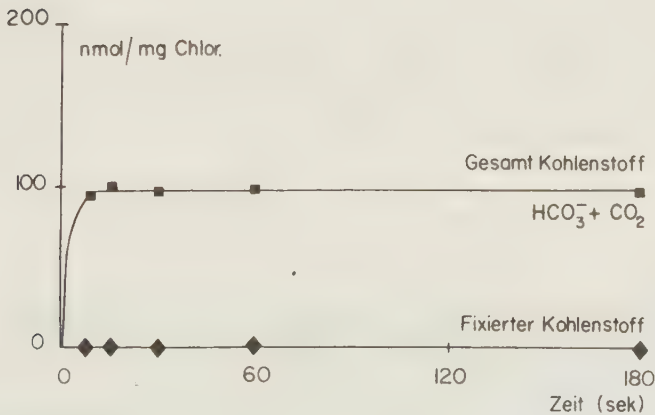


ABBILDUNG 23

VGL. ABB. 22A; DIE CHLOROPLASTEN WURDEN JEDOCH NICHT BELICHTET.
Weitere Einzelheiten siehe methodischer Teil.

Aus meßtechnischen Gründen ist es erforderlich, die CO_2 -Fixierungsrate möglichst niedrig zu halten. Deswegen wurden die weiteren Experimente bei 4°C durchgeführt. Im folgenden wird mit "Aufnahme von CO_2 /Bikarbonat" immer die im sorbitimpermeablen Chloroplastenraum vorhandene Menge bzw. Konzentration an anorganischem Kohlenstoff bezeichnet.

2.) Abhängigkeit der CO_2 /Bikarbonataufnahme vom pH im Medium, von der Bikarbonatkonzentration im Medium und von Belichtung.

Die Aufnahme von CO_2 /Bikarbonat ist stark pH-abhängig (Abb. 24). Bei niedrigem pH im Medium ($\text{pH } 7.0$) findet man in diesem Experiment eine 19fache Anreicherung in den Chloroplasten, während bei $\text{pH } 8.5$ die Konzentration nur 1.5 mal so hoch wie im Medium ist.

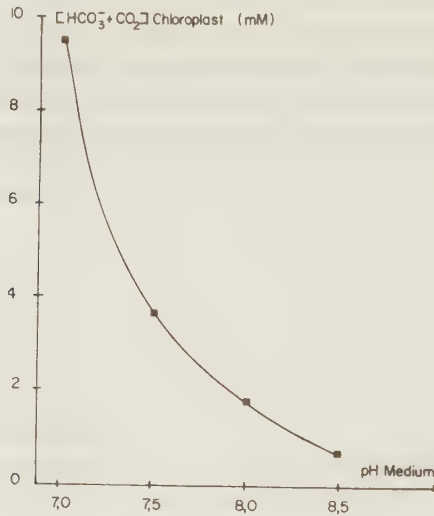


ABBILDUNG 24

BIKARBONATAUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM ($31.2 \mu\text{l/mg}$ Chlorophyll) VON BELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN ($17 \mu\text{g}$ Chlorophyll/ml) IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM MEDIUM.

Bikarbonatkonzentration im Medium 0.5 mM ; Temp. 4°C . Die Chloroplasten wurden 3 Minuten vorbelichtet, Inkubationszeit 3 Minuten.

Die Bikarbonataufnahme ist in einem weiten Bereich proportional der Bikarbonatkonzentration im Medium (Abb.25), bei hohen Konzentrationen von Bikarbonat im Medium (10mM) nimmt der Anreicherungsfaktor jedoch ab.

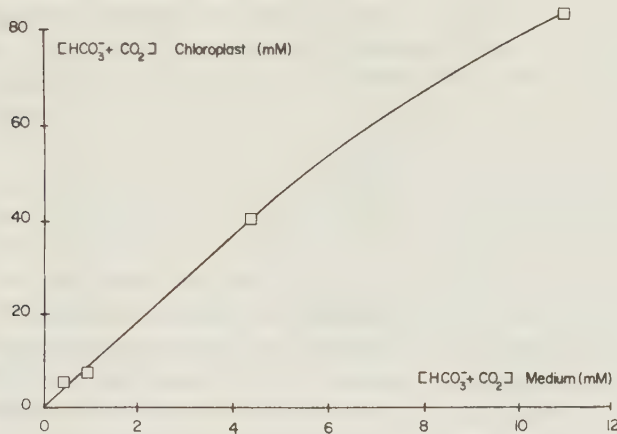


ABBILDUNG 25

BIKARBONATAUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM (28.9 μ l/mg Chlorophyll) VON BELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN (92 μ g Chlorophyll/ml) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BIKARBONATKONZENTRATION IM MEDIUM. Temp. 4°C. Die Chloroplasten wurden 3 Minuten vorbelichtet.

Tabelle 16 zeigt den Einfluß der Belichtung auf die CO₂/Bikarbonataufnahme in Chloroplasten. Die im sorbitimpermeablen Wasserraum gefundene Bikarbonatkonzentration ist in diesem Experiment im Licht etwa dreimal so hoch wie im Dunkeln. Diese lichtabhängige Mehraufnahme läßt sich durch Zugabe des Entkopplers CCCP vollständig verhindern.

TABELLE 16

BIKARBONATAUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN WASSERRAUM (28.6 μl /mg Chlorophyll) VON SPINATCHLOROPLASTEN (57 μg Chlorophyll/ml).
MESSUNG IM LICHT UND IM DUNKELN

BIKARBONATKONZENTRATION IM MEDIUM = 3.3mM; Inkubationszeit 3 Minuten; 4°C; bei Messung b) und c) wurden die Chloroplasten 3 Minuten vorbelichtet.

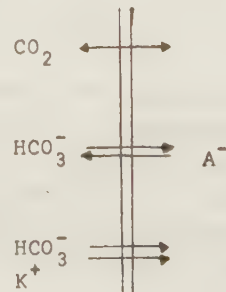
Inkubationsbedingungen	Bikarbonat-aufnahme(mM)	Anreicherungsfaktor
Dunkel	2.08	0.63
Licht	6.31	1.91
Licht + 1 μM CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon)	1.68	0.51

Die dargelegten Befunde zeigen, daß die Aufnahme von CO_2 /Bikarbonat in den sorbitimpermeablen Chloroplastenraum nach denselben Gesetzmäßigkeiten erfolgt wie die Aufnahme von DMO (vgl. Abschnitt III und IV). Diese Hypothese wird durch die im nächsten Abschnitt beschriebenen Experimente noch weiter erhärtet.

3.) Mechanismus der CO_2 /Bikarbonataufnahme

Für die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff (CO_2 und Bikarbonat) aus dem Medium (bzw. Cytoplasma) in den Chloroplasten sind verschiedene Mechanismen vorstellbar:

- a) CO_2 durchwandert passiv die Innenmembran
- b) Gegentransport von Bikarbonat gegen ein anderes Anion
- c) Kotransport von Bikarbonat mit einem Kation (z.B. H^+ , K^+ , Na^+ ,)



A^- = Anion

K^+ = Kation

Medium

Innen-
membran

Stroma

Welche der Möglichkeiten trifft nun zu? In diesem Zusammenhang ist die Tatsache sehr interessant, daß in Spinatchloroplasten eine hohe Aktivität des Enzyms Carboanhydrase gefunden worden ist (Everson u. Slack, 1968; Everson, 1970; Poincelot, 1972;) (siehe auch Tabelle 17), das folgende Reaktion katalysiert:

$$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \longleftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+.$$

Diese Reaktion läuft unkatalysiert relativ langsam ab. (Magid u. Turbeck, 1968;).

Die Ergebnisse unserer eigenen Untersuchungen sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Zur Bestimmung der Carboanhydraseaktivität in Spinatblättern wurden diese in einem hypotonem Medium homogenisiert (siehe Abschnitt II), wobei die morphologische Intaktheit der Chloroplasten völlig verloren geht. Wurde das Homogenat erhitzt, so wurden 99% der Carboanhydraseaktivität zerstört, womit der Enzymcharakter der Reaktion gezeigt ist. Die Aktivität im Homogenat verändert sich nicht, wenn die Homogenisierungszeit verdoppelt wird. Die Homogenisation ist also vollständig, und es treten keine Verluste der Enzymaktivität während dieses Vorgangs auf. Weiterhin wurde gefunden, daß die Carboanhydraseaktivität im Lauf des Experimentes nicht abnahm. Die gesamte Aktivität findet sich im Überstand des Homogenats, was die Löslichkeit des Enzyms beweist. Bezieht man auf den Chlorophyllgehalt, so findet man 85% der Gesamtcarboanhydraseaktivität aus Spinatblättern in den

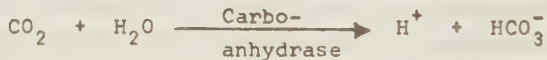
TABELLE 17

CARBOANHYDRASEAKTIVITÄT IN SPINATBLÄTTERN

(Methodische Einzelheiten siehe Abschnitt II).

	Aktivität bei 0°C (µmole/min. · mg Chlorophyll)
Blatthomogenat A, 75 sec. homogenisiert	3580
Blatthomogenat B, 150 sec. homogenisiert	3540
Überstand von Homogenat A	3690
Intakte Chloroplasten	165
Intakte Chloroplasten, vor der Messung osmotisch geschockt	2980

isolierten Chloroplasten. Unter dem Phasenkontrastmikroskop sind etwa 80% der Chloroplasten dieser Präparation morphologisch intakt. Es ist anzunehmen, daß der überwiegende Teil der "gebrochenen Chloroplasten" -obwohl noch chlorophyllhaltig- keine Carboanhydraseaktivität mehr enthält. Deshalb ist der Prozentsatz des Enzyms, der in den Chloroplasten lokalisiert ist, sogar noch höher als gemessen. Auch von Everson und Slack (1968) wurde beobachtet, daß in Spinatblättern ein großer Teil der Carboanhydraseaktivität in den Chloroplasten lokalisiert ist, während Poincelot (1972) nur 63% dieses Enzyms in den Chloroplasten findet. Die Carboanhydraseaktivität in intakten Chloroplasten ist latent, bis auf einen geringen Anteil, den man den "gebrochenen Chloroplasten" in der Suspension zuschreiben könnte. Zur Aktivitätsbestimmung müssen die Chloroplasten erst osmotisch geschockt werden, wobei das lösliche Enzym freigesetzt wird. Erst dann kann es das Kohlendioxid im Medium hydratisieren. Die Bildung der Protonen (gemessen mit einer pH-Elektrode) dient als Maß für die Enzymaktivität.



Aus der Latenz des Enzyms kann man folgern, daß die den Chloroplasten umgebende Innenmembran entweder für das zugegebene CO_2 oder die gebildeten Protonen undurchlässig sein muß. Einerseits ist CO_2 gut lipidlöslich und kann durch künstliche Membranen diffundieren (Blank u. Roughton, 1960), andererseits gibt es Hinweise, daß die Innenmembran für Protonen relativ impermeabel ist (vgl. Abschnitt IV).

Aus diesen Daten läßt sich der Schluß ziehen, daß die Produkte dieser Reaktion - Protonen und Bikarbonat - den Stromaraum bei intakter Innenmembran nicht verlassen können. Nimmt man an, daß die Permeabilitätseigenschaften der Innenmembran für den Transport in beiden Richtungen dieselben sind, so bedeutet dies, daß ein Kotransport von Bikarbonat zusammen mit einem Proton auf Grund der Latenz der Carboanhydraseaktivität in den Chloroplasten ausgeschlossen werden kann. (Möglichkeit c; jedoch haben wir keine Experimente, die einen Kotransport mit einem anderen Kation ausschließen können, durchgeführt).

Die Transportrate von CO_2 /Bikarbonat über die Innenmembran muß mindestens so hoch sein wie die Rate der CO_2 -Fixierung. Würde die Aufnahme über einen Gegentausch mit einem anderen Anion laufen (Möglichkeit b), so kämen dafür nur Verbindungen in Frage, die in den Chloroplasten in ausreichenden Mengen vorhanden sind bzw. während der CO_2 -Fixierung gebildet werden. Außerdem müßten sie die Innenmembran relativ leicht passieren können. Dafür kommen z.B. anorganisches Phosphat, 3Phosphoglyzerat, Aspartat, Glutamat oder Malat in Frage (Bassham et al., 1968; Heldt u. Rapley, 1970; Urbach et al., 1965; Ullrich et al., 1965; Aach u. Heber, 1967;).

Im Experiment der Tab. 18 wurden die Chloroplasten mit einer dieser Substanzen vorbeladen und anschließend mit Medium gewaschen (vgl. Heldt u. Rapley, 1970). Wie schon früher gezeigt wurde, erfolgt durch Zusatz von anorganischem Phosphat eine Freisetzung von anorganischem Phosphat und 3Phosphoglyzerat, während Aspartat, Glutamat und Malat durch Zugabe von Malat freigesetzt werden. (Heldt u. Rapley, 1970). Jedoch wurde durch Zugabe von Bikarbonat keine dieser Substanzen von den Chloroplasten an das Medium abgegeben. Daraus läßt sich folgern, daß es keinen Gegentausch von Bikarbonat mit einer dieser Substanzen gibt (Möglichkeit b).

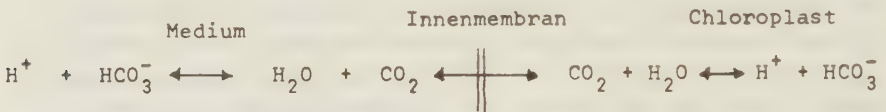
TABELLE 18

FREISETZUNG VON RADIOAKTIV MARKIERTEM PHOSPHAT, 3PHOSPHOGLYZERAT, MALAT, GLUTAMAT UND ASPARTAT AUS CHLOROPLASTEN DURCH ZUGABE VON BIKARBONAT.

Die Chloroplasten wurden für 2 Minuten bei 4°C mit den radioaktiv markierten Anionen (1mM) inkubiert und anschließend gewaschen. Der Rücktausch wurde durch Zugabe der unmarkierten Anionen gestartet und durch Filtrationszentrifugation nach 20 Sekunden gestoppt. Aus der Radioaktivität im Überstand wurde die freigesetzte Substanzmenge berechnet.

Zugesetztes Anion	Freigesetzte radioaktive Substanz (nmole/mg Chlorophyll · 20 sec.) 4°C				
	Anorganisches Phosphat	3Phospho- glyzerat	Malat	Glutamat	Aspartat
Bikarbonat	0.1	0.1	0.5	0.1	0.8
3Phosphoglyzerat	47.3	15.5	0.1	0.4	0.5
Malat	0.2	0.2	46.4	13.1	25.0

Die Daten der Abb. 24 weisen daraufhin, daß die Verteilung des CO_2 /Bikarbonat einem pH-Gradienten folgt. Das bedeutet aber, daß der Transport von Bikarbonat mit dem Transport eines Protons gekoppelt sein muß. Ein direkter Cotransport kann durch die Carboanhydraseversuche ausgeschlossen werden (vgl. oben). Ein indirekter Cotransport wäre gegeben, wenn die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff in die Chloroplasten über eine Diffusion von CO_2 über die Innenmembran erfolgen würde (Möglichkeit a), wie früher schon vermutet wurde (Everson, 1969).



Aufnahme- und Verteilungsmechanismus entsprächen damit denen von DMO (vgl. Abschnitt III, IV). Die Konzentration des Bicarbonats im Chloroplasten läßt sich dann durch folgende Gleichung beschreiben:

$$\log \frac{[\text{HCO}_3^-]_{\text{Chl.}}}{[\text{HCO}_3^-]_{\text{Med.}}} = \text{pH}_{\text{Chl.}} - \text{pH}_{\text{Med.}} \quad (\text{vgl. Abschnitt III})$$

Die Brauchbarkeit dieser Hypothese wurde im Experiment der Abb. 26 überprüft. Der pH-Gradient über die Innenmembran wurde durch verschiedene pH-Werte des Mediums variiert und das jeweilige Chloroplasten-pH mit DMO bestimmt. Die erhaltenen Meßpunkte stimmen mit der theoretisch zu fordernden Geraden mit der Steigung 1 (durchgezogene Linie) gut überein. Die Aufnahme von CO_2 /Bikarbonat verläuft demnach über eine Diffusion des Kohlendioxids durch die Innenmembran, während Bikarbonat diese Barriere nicht passieren kann. Im Chloroplasten stellt sich anschließend ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und Bikarbonat ein. Während die Konzentration des CO_2 im Stroma und Medium gleich groß ist, hängt die Verteilung des Bikarbonats in diesen beiden Kompartimenten vom pH-Gradienten über die Innenmembran ab. Die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromaraumes führt damit zu einer Anreicherung von Bikarbonat im Chloroplasten, deren physiologische Bedeutung in Abschnitt VII b diskutiert wird.

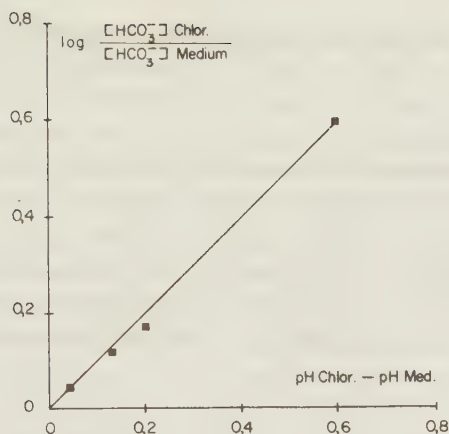


ABBILDUNG 26

LOGARITHMUS DER BIKARBONATVERTEILUNG ZWISCHEN DEM SORBITIMPERMEABLEN CHLOROPLASTENRAUM UND DEM MEDIUM IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-GRADIENTEN ÜBER DIE INNENMEMBRAN.

Temp. 8°C, Bikarbonatkonzentration im Medium: 3.3mM, DMO-Konzentration im Medium: 1mM; 80 µg Chlorophyll/ml; sorbitimpermeabler Wasser-raum: 25 µl/mg Chlorophyll.

Die Messungen des Chloroplasten-pH und der Bikarbonatverteilung wurden in Parallelproben ausgeführt, die entweder ^{14}C -Bikarbonat und unmarkiertes DMO oder ^{14}C -DMO und unmarkiertes Bikarbonat enthielten. Die Chloroplasten wurden 3 Minuten vor und während der Messung be-lichtet.

4.) Hemmung der CO_2 /Bikarbonat-Aufnahme durch Diamox

Diamox (Azetazolamid) - ein Carboanhydrase-Hemmer (Maren, 1967) - vermindert die Aufnahmegeschwindigkeit von CO_2 /Bikarbonat in Chloroplasten, hat jedoch auf die sich einstellende Endkonzentration (gemessen nach 120 sec.) keinen Einfluß (Tab. 19). Man kann diesen Effekt als Hemmung der durch Carboanhydrase katalysierten Hydratation des CO_2 im Chloroplastenstroma auffassen. Diese Reaktion ist somit bei der Aufnahmerate von CO_2 /Bikarbonat der limitierende Schritt. Das gleiche könnte man auch von der Dehydratation des Bikarbonats im Medium erwarten.

Da wir jedoch mit sehr verdünnten Chloroplastensuspensionen arbeiten, beträgt die ins Stroma aufgenommene CO_2 /Bikarbonatmenge nur etwa 10% des CO_2 , das sich im Medium mit Bikarbonat im Gleichgewicht befindet. Eine Dehydratation von Bikarbonat im Medium ist also unter diesen experimentellen Bedingungen für den CO_2 -Transport nicht notwendig.

Diese Diamox-Hemmung ist jedoch von Experiment zu Experiment sehr verschieden, sie reicht von 0%-60%. Da die Carboanhydrase im Stroma eine hohe Aktivität besitzt, dürfte es manchmal schwierig sein, eine meßbare Hemmung der CO_2 /Bikarbonat - Aufnahme zu bekommen.

TABELLE 19

HEMMUNG DER CO_2 /BIKARBONATAUFNAHME IN DEN SORBITIMPERMEABLEN CHLOROPLASTENRAUM VON BELICHTETEN SPINATCHLOROPLASTEN DURCH DIAMOX.
Bikarbonatkonzentration im Medium: 0.1mM; 32 μg Chlorophyll/ml.
Temp. 4°C.

Zeit (sec.)	Diamox (mM)	CO_2 /Bikarbonat- aufnahme (mM)	Hemmung (%)
7	-	0.31	61
	0.5	0.12	
120	-	0.60	0
	0.5	0.62	

Die Rolle der Carboanhydrase in Chloroplasten ist jedoch bis heute nicht voll aufgeklärt (Walker, i. Dr.). Wie von Cooper et al. (1969) gezeigt werden konnte, stellt Kohlendioxid- und nicht Bikarbonat- das Substrat der Ribulosediphosphat-carboxylase dar. Aus diesem Grunde besitzt diese Steigerung wahrscheinlich keine große physiologische Bedeutung (vgl. auch Abschnitt VII b).

VI. DAS STROMA-pH ALS REGULATIONSFAKTOR DER CO_2 -FIXIERUNG

Von mehreren Autoren (Pedersen et al., 1966; Bassham et al., 1968; Jensen u. Bassham 1968, Bassham u. Krause, 1969) konnte gezeigt werden, daß die CO_2 - Fixierung beim Licht-Dunkel-Übergang zum Stillstand kommt, was jedoch nicht durch den Mangel an ATP und NADPH bedingt ist, sondern auf eine andere Ursache zurückgeführt werden muß. Diskutiert wurden in diesem Zusammenhang Änderungen des Redoxgrades von Komponenten der Photosysteme, Änderungen der Magnesiumkonzentration und des pH im Stromaraum beim Licht-Dunkel-Wechsel (vgl. Abschnitt VII c Diskussion).

Die folgenden Experimente beschreiben die Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung vom pH im Stromaraum, die durch die lichtinduzierte Alkalisierung dieses Kompartimentes auch von physiologischer Bedeutung ist. Dabei wurde von den in Tabelle 9 beschriebenen Möglichkeiten Gebrauch gemacht, das Stroma-pH gezielt zu variieren. Auf diese Weise kann der Einfluß anderer Parameter (siehe oben) auf die Steuerung der CO_2 -Fixierung ausgeschaltet werden. Falls das Stroma-pH tatsächlich eine regulatorische Funktion besitzt, so sollte es möglich sein, durch Einstellung des optimalen Stroma-pH und externe Zufuhr von Energie eine CO_2 -Fixierung auch im Dunkeln zu erhalten. Ein solches Modellsystem der " CO_2 -Dunkel-Fixierung" wird in Teil b) beschrieben und seine Abhängigkeit vom Stroma-pH untersucht. Die physiologische Bedeutung der Regulation der CO_2 - Fixierung durch das Stroma-pH wird in Abschnitt VII c diskutiert.

a) CO₂-Fixierung in Abhängigkeit vom Stroma-pH

Die Bilanzgleichung der CO₂-Fixierung in isolierten Chloroplasten kann auf folgende Weise beschrieben werden. (siehe auch Einleitung):



Die Phosphoglyzeratreduktion stellt einen Teilschritt des Calvin-Zyklus dar:



In beiden Fällen liefern Photosystem I und II die dafür notwendigen Reduktionsäquivalente (NADPH) und die Energie (ATP).



Da bei dieser Reaktion in stöchiometrischem Verhältnis zu NADPH Sauerstoff freigesetzt wird, kann die O₂-Entwicklung bei der CO₂ - Fixierung als Maß für die gebildete Menge Kohlenstoff, bei der PGS-Reduktion als Maß für die Menge des entstandenen Dihydroxyazetonphosphats dienen. Wir benutzten die Phosphoglyzerat-Reduktion in den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten als Indikatorreaktion, da sie in etwa dem gleichen Verhältnis ATP und NADPH benötigt wie die CO₂-Fixierung.

Abb. 27 zeigt die Abhängigkeit der CO₂-Fixierung vom pH im Medium, wie sie ähnlich auch von Avron und Gibbs (1974) beschrieben wurde. Bei niedrigem Medium-pH ist die CO₂-Fixierung vollständig gehemmt, zur maximalen Aktivität ist ein pH von 7.8 notwendig.

Trägt man die Raten der CO₂-Fixierung gegen das pH im Stromaraum auf (Abb. 28, gleiches Experiment wie Abb. 27), so erhält man ein ähnliches Bild, wobei die Kurve steiler verläuft und um etwa 0.2 pH-Einheiten zur alkalischen Seite hin verschoben ist.

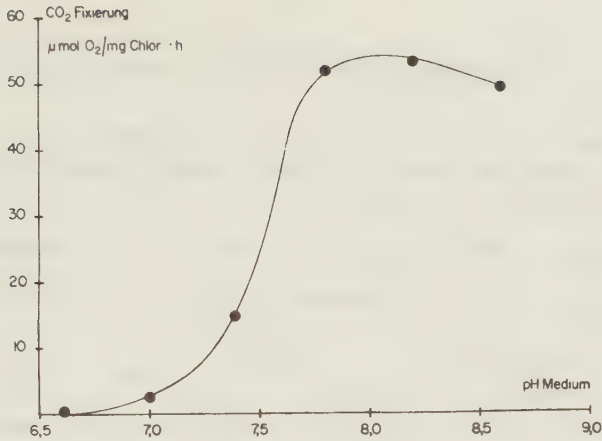


ABBILDUNG 27

CO₂-FIXIERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM MEDIUM, GEMESSEN IN μmole O₂/mg Chlorophyll · h. $[\text{HCO}_3^-] = 2\text{mM}$; $[P_a] = 0.25$ l; 47 μg Chlorophyll/ml. 20°C; Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

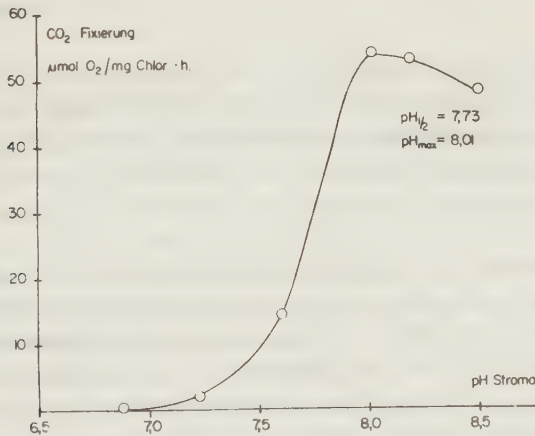


ABBILDUNG 28

CO₂ - FIXIERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM STROMARAUM, GEMESSEN IN μmole/mg Chl. · h; (gleiches Experiment wie Abb. 27)
pH-Stroma-Bestimmung mit 1 mM ¹⁴C-DMO. Sorbitimpermeabler Wasser-
raum = 41.4 μl/mg Chlorophyll. Experimentelle Einzelheiten siehe
methodischer Teil.

TABELLE 20

ABHÄNGIGKEIT DER CO_2 -FIXIERUNG -GEMESSEN IN $\mu\text{mole O}_2/\text{mg Chl.}\cdot\text{h}$ - VOM STROMA-pH.

Zusammenfassung mehrerer Experimente mit gleichem Aufbau wie in Abb. 28. pH-Stroma-Bestimmung mit $1\text{mM }^{14}\text{C-DMO}$. Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

$\text{pH}_{\text{max}} = \text{pH}_{\text{stroma}}$ - Wert mit maximaler Rate der CO_2 -Fixierung.

$\text{pH}_{1/2} = \text{pH}_{\text{stroma}}$ - Wert mit halbmaximaler Rate der CO_2 -Fixierung.

Experiment	Maximalrate ($\mu\text{mole O}_2/\text{mg Chl.}\cdot\text{h}$)	$\text{pH}_{1/2}$	pH_{max}
1	54.0	7.73	8.01
2	38.9	7.63	7.95
3	74.0	7.95	8.20
4	164.7	7.76	8.10
5	72.0	7.95	8.30

In Tabelle 20 sind verschiedene Versuche zusammengefaßt, die mit unterschiedlichem Spinatmaterial auf die gleiche Weise wie das zuletzt beschriebene Experiment durchgeführt wurden. Man erhält in allen Fällen ähnliche Bilder wie in Abb. 28 mit einer guten Übereinstimmung der pH_{max} - und $\text{pH}_{1/2}$ - Werte.

Völlig anders als die CO_2 -Fixierung verhält sich die Phosphoglyzerat-Reduktion. Sie ist in dem untersuchten Bereich nahezu unabhängig vom Stroma-pH (Abb. 29). Die PGS-Reduktion benötigt ebenso wie die CO_2 -Fixierung ATP und NADPH, das beides in der photosynthetischen Elektronentransportkette gebildet wird. Der durch das Stroma-pH regulierte Schritt der CO_2 -Fixierung ist somit weder in der Bildung von ATP und NADPH noch in der enzymatischen Reduktion des Phosphoglyzerats zu Dihydroxyazetonphosphat - die einen Teilschritt des Calvin-Zyklus darstellt - zu suchen.

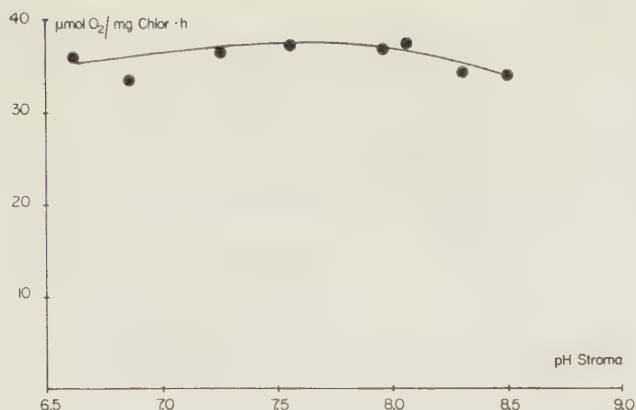


ABBILDUNG 29

PGS-REDUKTION IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM STROMARAUM GEMESSEN IN $\mu\text{mole O}_2/\text{mg Chl.} \cdot \text{h}$. pH-Stroma-Bestimmung mit $1\text{mM } ^{14}\text{C-DMO}$.

PGS = 2mM ; Pa = 3mM ; $67 \mu\text{g Chlorophyll/ml}$; sorbitimpermeabler Wasser-
raum = $28.1 \mu\text{l/mg Chl.}$; Temp. 20°C ; Experimentelle Einzelheiten
siehe methodischer Teil.

In Abb. 30 wurde durch Zugabe unterschiedlicher Azetatkonzentrationen zum Medium das Stroma-pH artefiziell erniedrigt (vgl. Abschnitt IV d). Mißt man nun die Raten der CO_2 -Fixierung in Abhängigkeit vom pH im Medium, so verschiebt sich $\text{pH}_{1/2}$ mit steigender Azetatkonzentration immer mehr zu alkalischeren Werten. Bezieht man die Raten jedoch auf das pH im Stromaraum (Abb. 31), so ergeben die Meßpunkte der Abb. 30 eine homogene Kurve, obwohl in diesem Versuch das Stroma-pH durch zwei völlig unabhängige Methoden (Variation des Medium-pH, Zugabe unterschiedlicher Azetatkonzentrationen) eingestellt wurde. Im verwendeten Konzentrationsbereich hat Azetat keinen Einfluß auf die Phosphoglyzeratreduktion, wie hier nicht gezeigte Experimente ergeben haben.

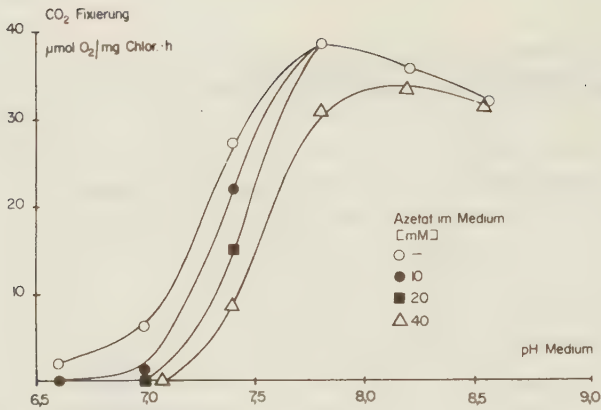


ABBILDUNG 30

CO₂-FIXIERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM MEDIUM GEMESSEN IN μmole O₂/mg Chl. · h. EINFLUSS VERSCHIEDENER AZETATKONZENTRATIONEN HCO₃⁻ = 2mM; Pa = 0.25mM; 80μg Chl./ml; Temp. 20°C. Verwendete Azetatkonzentrationen -, 10mM, 20mM, 40mM, Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

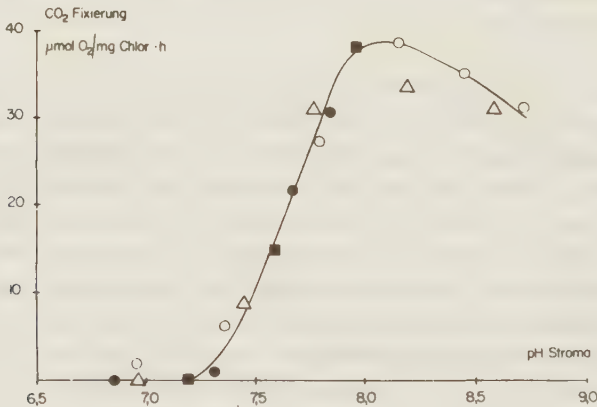


ABBILDUNG 31

CO₂-FIXIERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH IM STROMARAUM, GEMESSEN IN μmole O₂/mg Chl. · h. EINFLUSS VERSCHIEDENER AZETATKONZENTRATIONEN pH-Stroma-Bestimmung mit 1mM ¹⁴C-DMO. Sorbitimpermeabler Wasser-raum: 23.8 μl/mg Chl. (ohne Azetat)
22.9 μl/mg Chl. (mit 40mM Azetat)
gleiches Experiment wie in Abb. 30

TABELLE 21

ABHÄNGIGKEIT DER CO_2 -FIXIERUNG MIT 1mM BZW. 20mM BIKARBONAT VOM pH IM MEDIUM UND IM STROMA.

Messung der Raten als $\mu\text{mole O}_2 / \text{mg Chl.} \cdot \text{h}$. Gleichzeitige pH-Stroma-Messung mit 1mM ^{14}C -DMO. $\text{HCO}_3^- = 1\text{mM}$ bzw. 20mM, $P_a = 0.25\text{mM}$, Temp. 20°C , 60 μg Chlorophyll/ml. Sorbitimpermeabler Wasserraum: 13.5 $\mu\text{l/mg}$ Chlorophyll.

CO_2 - Fixierung (in $\mu\text{mole} / \text{mg Chl.} \cdot \text{h}$)				
pH _{Medium}	mit 1mM HCO_3^-		mit 20mM HCO_3^-	
	pH _{Stroma}	Rate	pH _{Stroma}	Rate
6.40	6.94	0	6.53	0
7.30	7.57	28.9	7.30	0
7.60	7.88	53.1	7.56	29.8
7.90	8.29	48.6	7.96	46.0

Im Experiment der Tabelle 21 wurden für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung zwei verschiedene Bikarbonatkonzentrationen verwendet (1mM und 20mM HCO_3^-). Während man bei pH 7.9 im Medium in beiden Fällen gleich hohe Fixierungsraten erhält, wird die CO_2 -Fixierung mit 20mM Bikarbonat bei niedrigerem pH viel deutlicher gehemmt als mit 1mM. Wie in Abschnitt V c gezeigt wurde, verhält sich CO_2 /Bikarbonat - analog DMO und Azetat - als schwache Säure und führt damit konzentrationsabhängig zu einer Erniedrigung des pH im Stromaraum. Bezieht man die Raten auf das Stroma-pH, so erhält man sowohl mit 1mM als auch mit 20mM Bikarbonat in etwa die gleichen Werte.

In Abb. 32 und 33 verwendeten wir die beiden Entkoppler CCCP und Methylamin, um den Einfluß des Stroma-pH auf die CO_2 -Fixierung aufzuzeigen. Mit steigender Entkopplerkonzentrationen sinkt das pH über die Thylakoidmembran ab und damit auch die Rate der Phosphoglyzeratreduktion. Auffallend ist, daß bei Entkopplung mit CCCP die CO_2 -Fixierung bereits bei niedrigerer CCCP-Konzentration abfällt als die PGS-Reduktion, während bei Zugabe von

Methylamin beide Reaktionen in etwa gleichem Maße gehemmt werden. Auch dieser Befund kann als pH-Effekt gedeutet werden: Während Methylamin das Stroma-pH weitgehend unbeeinflusst läßt, führen bereits niedrige CCCP-Konzentrationen zu einem deutlichen pH-Abfall im Stromaraum (vgl. Abschnitt IV b) und damit zu einer Hemmung der CO_2 -Fixierung, obwohl noch genügend ATP zur Verfügung stehen muß, wie die Raten der Phosphoglyzerat-Reduktion beweisen.

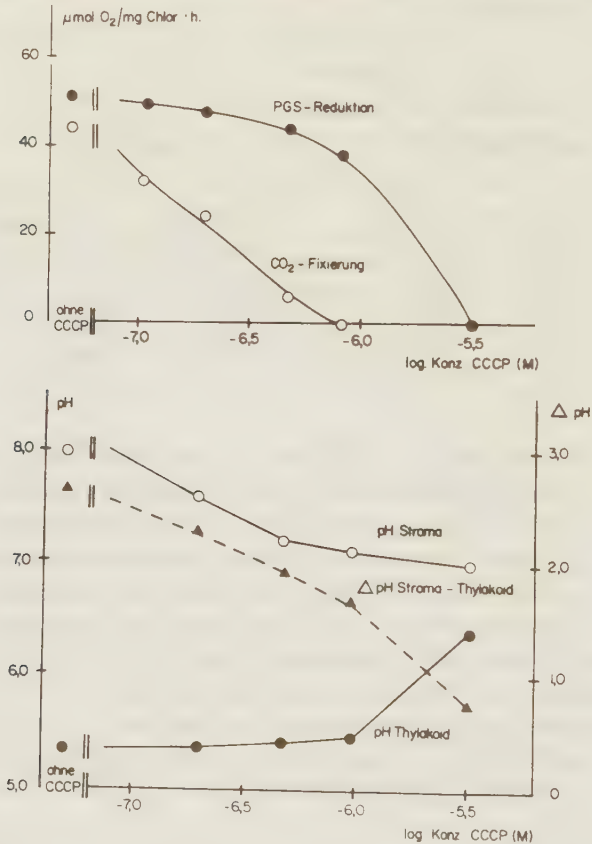


ABBILDUNG 32

EINFLUSS VON CCCP AUF CO_2 -FIXIERUNG UND PHOSPHOGLYZERATREDUKTION
GEMESSEN ALS $\mu\text{mole O}_2/\text{mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$.

Gleichzeitige Bestimmung des Stroma- und Thylakoid-pH mit 1mM ^{14}C -DMO und 0.03mM ^{14}C -Methylamin, CO_2 -Fixierung: 2mM HCO_3^- ; 0.25mM Pa
PGS Reduktion: 2mM PGS; 3mM Pa; Temp. 20°C , 48 μg Chlorophyll/ml
sorbitimpermeabler Wasserraum: 23.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chlorophyll.

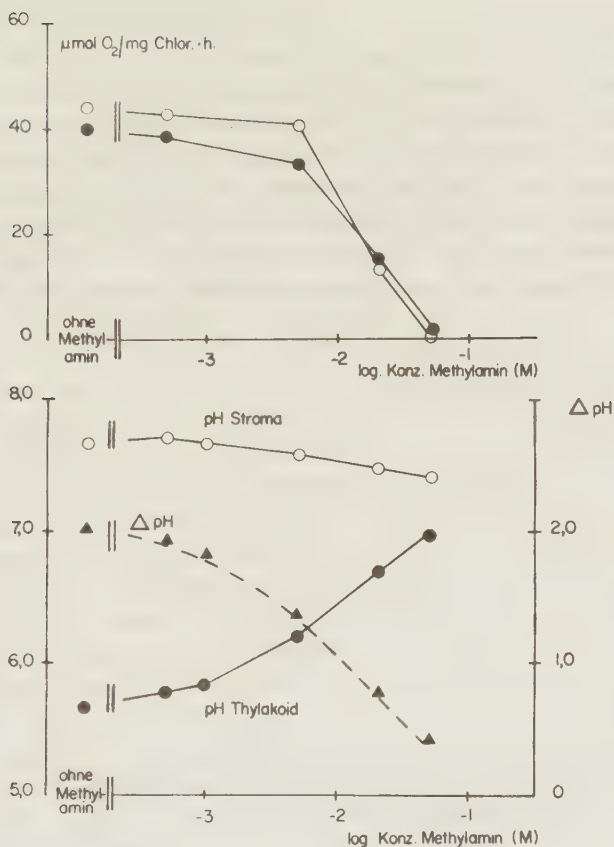


ABBILDUNG 33

EINFLUSS VON METHYLAMIN AUF CO_2 -FIXIERUNG UND PHOSPHOGLYZERAT-REDUKTION - GEMESSEN ALS $\mu\text{mole O}_2/\text{mg Chl.} \cdot \text{h.}$ Gleichzeitige Bestimmung von pH-Stroma und pH-Thylakoidraum mit $1\text{mM } ^{14}\text{C-DMO}$ und $0.03\text{mM } ^{14}\text{C-Methylamin}$.

Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

CO_2 -Fixierung: 2mM HCO_3^- ; 0.25 mM Pa ; PGS Reduktion: 2mM PGS ; 3mM Pa ; Temp. 20°C , $42\text{ }\mu\text{g Chlorophyll/ml}$; sorbitimpermeabler Wasserraum: $24.0\text{ }\mu\text{l/mg Chlorophyll}$.

Zusammenfassend können die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente folgendermaßen interpretiert werden: Die CO_2 -Fixierung in isolierten Chloroplasten zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom pH im Stromaraum. Sie besitzt bei einem Stroma-pH von ungefähr 8.0 ihr Optimum und wird mit fallenden pH-Werten reduziert. Bei einem pH unter 7.2 ist keine CO_2 -Fixierung in nennenswertem Ausmaß mehr möglich. Da bei pH 7.2 die PGS-Reduktion nicht vermindert ist, kann die Hemmung der CO_2 -Fixierung bei diesem pH nicht durch ein verringertes Angebot von ATP oder NADPH bedingt sein.

b) CO₂-Fixierung im Dunkeln

Bei der CO₂-Fixierung via Calvin-Zyklus wird ATP und NADPH benötigt, um aus Phosphoglyzerat Dihydroxyazetonphosphat zu bilden, das dann weiter in Ribulosemonophosphat umgewandelt wird. Für die Phosphorylierung zum Ribulosediphosphat ist noch ein weiteres Molekül ATP notwendig. ATP und NADPH werden während des photosynthetischen Elektronentransports produziert. Grundsätzlich sollte eine CO₂-Fixierung in intakten Chloroplasten auch im Dunkeln möglich sein, wenn den Chloroplasten ATP und DAP angeboten wird. Während DAP über den Phosphattranslokator schnell in die Chloroplasten aufgenommen wird (Heldt u. Rapley, 1970), ist der direkte Transport von ATP über den Adeninnukleotidtranslokator ein sehr langsamer Prozeß (Heldt, 1969). Allerdings ist über den Dihydroxyazetonphosphat/Phosphoglyzerat-Zyklus via Phosphattranslokator ein indirekter Transport von ATP und NADPH mit hoher Geschwindigkeit möglich (Zusammenfassung bei Heber, 1974). Abb. 34 zeigt ein hypothetisches Schema der CO₂-Fixierung isolierter Chloroplasten im Dunkeln. Dem Medium zugesetztes DAP wird in die Chloroplasten transportiert. Ein Teil davon wird mit Hilfe von Aldolase, Fruktosediphosphatase und weiterer Enzyme des Calvin-Zyklus in Ribulosemonophosphat umgewandelt. Der andere Teil wird zu Phosphoglyzerat oxidiert, wobei ATP und NADPH entsteht. Das ATP wird zur Phosphorylierung des Ribulosemonophosphat zu Ribulosediphosphat verwendet. Damit läßt sich die Reaktionsgleichung der CO₂-Dunkel-Fixierung folgendermaßen darstellen:



Das gebildete Phosphoglyzerat wird über den Phosphattranslokator ins Medium transportiert. Da die Innenmembran für Pyridinnukleotide impermeabel ist, häuft sich NADPH in den Chloroplasten an. Würde es nicht wieder zu NADP⁺ oxidiert werden, käme die CO₂-Fixierung im Dunkeln zum Stillstand. Dies wird durch Zugabe von Oxalazetat verhindert, das via Dicarboxylattranslokator in die Chloroplasten aufgenommen wird. Im Stroma katalysiert die Malatdehydrogenase die Reduktion zu Malat unter Verbrauch von NADPH. Malat wird anschließend

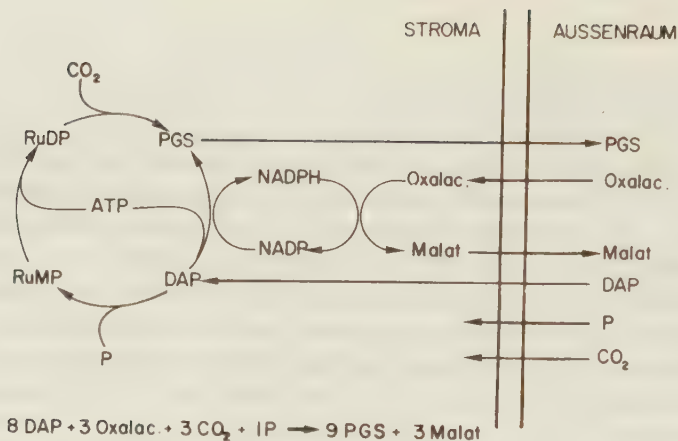


ABBILDUNG 34

HYPOTHETISCHES SCHEMA DER CO₂-FIXIERUNG IM DUNKELN

Über den Dicarboxylat-Translokator im Gegentausch mit Oxalazetat ins Medium transportiert. Dies führt zu einer Modifizierung der obigen Gleichung:



Im Experiment der Tabelle 23 wurde die Brauchbarkeit dieser Hypothese überprüft.

Tatsächlich erhält man mit diesem System eine beträchtliche CO₂-Fixierung im Dunkeln, wenn die dafür notwendigen Substanzen (DAP, Phosphat, Oxalazetat) vorhanden sind. Dabei ist es wichtig, daß die Phosphatkonzentration etwa dreimal so hoch ist wie die Konzentration von Dihydroxyazetonphosphat. Ohne Phosphat wird die CO₂-Fixierungsrate beträchtlich verringert, wie hier nicht gezeigte Experimente ergeben haben. Steigende Phosphatkonzentrationen erhöhen die Rate, der Maximalwert wird bei einem Quotienten $\text{Pa: DAP} \approx 3:1$ erreicht. Die angeführten Kontrollen (Weglassen einer Komponente, Zugabe von Phosphoglyzerat anstatt DAP, bzw. Malat anstatt Oxalazetat) verdeutlichen die Spezifität der Reaktion. Die Dunkelfixierung läßt sich nur mit intakten, nicht mit geschockten Chloroplasten durchführen. Mit dem SH-Donator Dithiothreitol (DTT)

erhält man -ähnlich wie bei der CO_2 -Fixierung mit belichteten Chloroplasten - eine Stimulation der Rate um das 1.5 - 5 fache.

TABELLE 22

CO_2 -FIXIERUNG IM DUNKELN

Medium: pH 8.8, ^{14}C - NAHCO_3 10 mM (1.7 Ci/Mol); 0.18 mg Chlorophyll/ml; Temp. 20°C. Die Berechnung der CO_2 -Fixierungsrate erfolgte über die zwischen vier und sechs Minuten gebildete Menge fixierten Kohlenstoffs. Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

	Zugabe von (mM)	Rate der CO_2 -Fixierung ($\mu\text{mole Kohlenstoff}$ fixiert/mg Chl. $\cdot$ h)
Intakte Chloroplasten + 5mM DTT(Dithiothreitol)	Phosphat 16	0.03
"	Phosphat 16 + Oxalazetat 5	0.01
"	Phosphat 16 + DAP 5	0.11
"	Phosphat 16 + PGS 5 + Oxalazetat 5	0.04
"	Phosphat 16 + DAP 5 + Malat 5	0.13
"	DAP 5 + Oxalazetat 5	0.28
"	Phosphat 16 + DAP 5 + Oxalazetat 5	3.54
Intakte Chloroplasten ohne DTT	Phosphat 16 + DAP 5 + Oxalazetat 5	1.99
osmotisch geschockte Chloroplasten	Phosphat 16 + DAP 5 + Oxalazetat 5	0.01

Im Experiment der Abb. 35 wurde das Produkt der Dunkel- CO_2 -Fixierung elektrophoretisch bestimmt.



ABBILDUNG 35

ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER BEI DER DUNKEL- CO_2 -FIXIERUNG (Meßzeit 6 Minuten) ERHALTENEN PRODUKTE.

Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil. HCO_3^- 10mM (10 Ci/Mol); Phosphat 16mM; DAP 5mM; Oxalazetat 5mM ; DTT 5mM; Temp. 20°C; $\text{pH}_{\text{Medium}} = 8.8$; 0.37 mg Chlorophyll/ml.

Die identifizierte Verbindung zeigt die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie ^{14}C -Phosphoglycerinsäure. Dasselbe Ergebnis erhält man bei der Bestimmung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (nicht abgebildet).

Durch enzymatische Bestimmung wurde im Experiment der Abbildung 36 die Kinetik des DAP-Verbrauchs und der PGS- und Malat-Bildung verfolgt. Aus meßtechnischen Gründen wurden suboptimale DAP- und Oxalazetat-Konzentrationen eingesetzt. Deswegen sind die in

diesem Experiment erhaltenen Raten relativ niedrig. Die Reaktion kommt erst dann zum Stillstand, wenn das zugesetzte DAP völlig verbraucht ist.

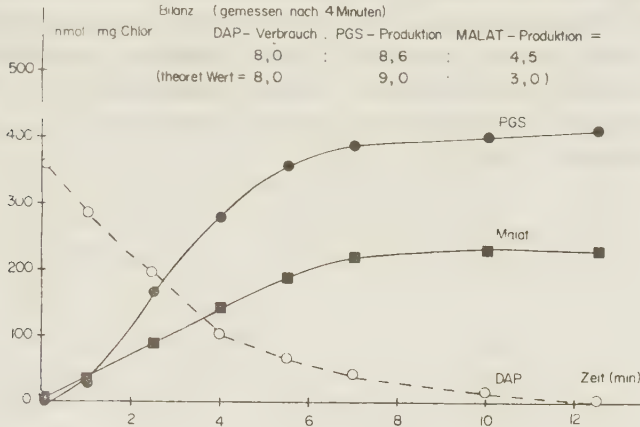


ABBILDUNG 36

KINETIK DER PGS- UND MALATPRODUKTION UND DES DAP-VERBRAUCHS BEI DER DUNKEL-CO₂-FIXIERUNG. DAP = 1mM; Oxalazetat = 1mM; Pa = 3mM; DTT = 10mM; Temp. 20°C; 0.25 mg Chlorophyll/ml; pH_{Medium} = 8.8

Das deutet darauf hin, daß die Dunkel-CO₂-Fixierung ein exergonischer Prozeß ist, bedingt durch folgende Teilreaktionen des Calvin-Zyklus: Hydrolyse von Fructosediphosphat, Phosphorylierung von Ribulosemonophosphat und Carboxylierung von Ribulosediphosphat (Zusammenfassung siehe Bassham und Krause, 1969).

Die Stöchiometrie der Reaktion - gemessen nach vier Minuten - stimmt in etwa mit Gleichung b) überein, bis auf die Tatsache, daß zuviel Malat produziert wurde. Als Erklärungsmöglichkeit bietet sich eine partielle, unspezifische ATP-Hydrolyse in den Chloroplasten an. Wird z.B. ein Drittel des gebildeten ATP nicht zur Phosphorylierung von Ribulosemonophosphat verwendet, würden sich die stöchiometrischen Verhältnisse folgendermaßen verschieben:

DAP - Verbrauch : PGS - Produktion ; Malat - Produktion = 8:8.8:3.8

Untersucht man die Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung im Dunkeln von der verwendeten Bikarbonatkonzentration (Abb. 37), so erhält man ein K_M für Bikarbonat von 2.6mM, was bei einem Medium-pH von 8.8 einem K_M -Wert für CO_2 von etwa $6 \mu\text{M}$ entspricht. Da die Innenmembran für CO_2 frei permeabel ist (vgl. Abschnitt V c), kann man annehmen, daß die CO_2 -Konzentration im Stroma genauso hoch ist wie im Medium.

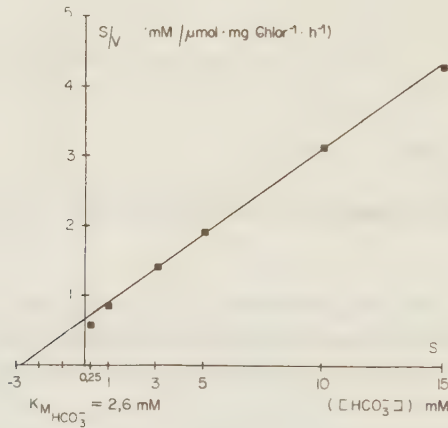


ABBILDUNG 37

BIKARBONAT-KONZENTRATIONENABHÄNGIGKEIT DER CO_2 -FIXIERUNG IM DUNKELN. BESTIMMUNG DER RATEN AUS DER ZWISCHEN VIER UND SECHS MINUTEN FIXIERTEN MENGE KOHLENSTOFFS.

DAP = 5mM; Oxalazetat = 5mM; Pa = 16mM; pH_{Medium} = 8.8; 0.37mg Chlorophyll/ml; spezifische Aktivität des verwendeten Bikarbonats; 0.7 - 13.8 Ci/Mol. Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

Es besteht eine gute Übereinstimmung des von uns gefundenen K_M -Wertes der Dunkelfixierung für CO_2 mit dem K_M -Wert der Ribulosediphosphatcarboxylase für CO_2 , gemessen in Chloroplasten kurz nach osmotischem Schock (Bahr und Jensen, 1974).

Die aufgeführten Befunde zeigen, daß eine Carboxylierung von Ribulosediphosphat in unbelichteten Chloroplasten möglich ist. Dabei ist jedoch zu beachten, daß alle Experimente bei einem Medium-pH von 8.8 durchgeführt wurden. Im Experiment der Abb. 38 wurde die Abhängigkeit der Dunkel- CO_2 -Fixierung vom pH im Medium untersucht. Das erhaltene Bild ist dem im vorigen Abschnitt für die CO_2 -Fixierung im Licht beschriebenen (Abb. 27) sehr ähnlich.

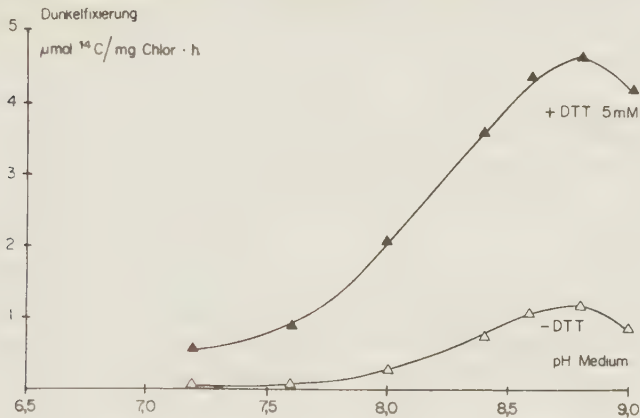


ABBILDUNG 38

ABHÄNGIGKEIT DER CO_2 -FIXIERUNG IM DUNKELN VOM pH IM MEDIUM.

Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

$\text{HCO}_3^- = 7.2\text{mM}$ (2Ci/Mol); DAP = 5mM; Oxalazetat = 5mM; Pa = 16mM;

+ DTT = 5mM; Temp. 20°C; 0.10 mg Chlorophyll/ml.

Bezieht man die Raten auf das Stroma-pH (Abb.39) so erhält man auch nahezu identische Werte für pH 1/2 bzw. pH_{max} . Zugabe von DTT steigert zwar die Fixierungsrate, verändert jedoch nicht die pH-Abhängigkeit.

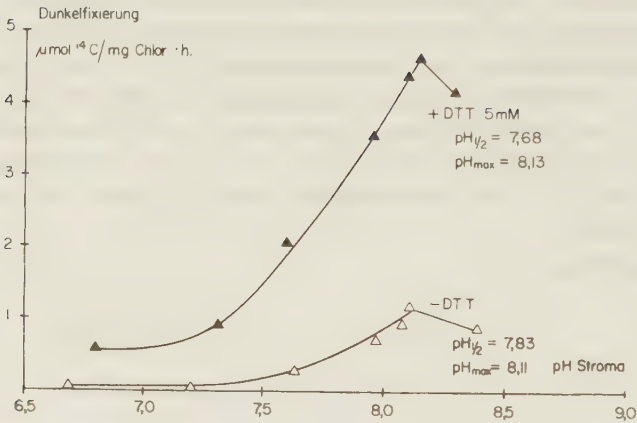


ABBILDUNG 39

ABHÄNGIGKEIT DER CO_2 -FIXIERUNG IM DUNKELN VOM pH IM STROMARAUM
 GLEICHES EXPERIMENT WIE ABB. 38. pH-Stroma-Bestimmung mit 1mM
 ^{14}C -DMO; sorbitimpermeabler Chloroplastenraum: 33.0 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Chloro-
 phyll; Experimentelle Einzelheiten siehe methodischer Teil.

Die geschilderten Experimente zeigen, daß auch im Dunkeln eine CO_2 -Fixierung prinzipiell möglich ist. Sie kann -ebenso wie die CO_2 -Fixierung im Licht- durch das Stroma-pH "ein- und ausgeschaltet" werden. Durch die lichtabhängigen pH-Änderungen im Stromaraum erhält dieser Vorgang wahrscheinlich auch eine physiologische Bedeutung, worauf in Abschnitt VIIc noch näher eingegangen wird.

VII. DISKUSSION

a) pH-Gradient über die Thylakoid- und Innenmembran und Stroma-pH

Analog den Ergebnissen, die mit isolierten Thylakoiden gewonnen wurden, findet man in intakten Spinachchloroplasten bei Belichtung einen Protonentransport über die Thylakoidmembran, der zu einer Erniedrigung des pH im Thylakoidraum führt. Durch simultane pH-Messung im Stromaraum konnte gezeigt werden, daß gleichzeitig eine Alkalisierung dieses Kompartimentes um etwa 0.7-1.0 pH-Einheiten erfolgt. Der pH-Gradient über die Thylakoidmembran beträgt bei maximaler Lichtintensität 2.0-2.7 pH-Einheiten, er schwankt im Dunkeln in Abhängigkeit von der Temperatur zwischen 0 und 1.0.

Die beschriebene Methode zur gleichzeitigen pH-Bestimmung im Stroma- und Thylakoidraum erlaubt es erstmals, die licht-induzierten Protonenbewegungen im Chloroplasten in ihrer Gesamtheit zu erfassen und deren Auswirkungen auf den Stoffwechsel des Chloroplasten zu untersuchen. Während die Aufklärung des Zusammenhanges zwischen Photophosphorylierung und dem pH-Gradienten über die Thylakoidmembran schon lange Gegenstand intensiver Forschung ist (Zusammenfassung siehe Witt et al, 1968), konnte der Einfluß des Stroma-pH auf die CO_2 -Fixierung und die Bedeutung des pH-Gradienten über die Innenmembran für Transportvorgänge zwischen Chloroplast und Cytoplasma bisher nicht direkt untersucht werden, da es an geeigneten Methoden fehlte, das Stroma-pH zu messen. Die dargelegten Befunde zeigen aber, wie notwendig es ist, diese Faktoren bei solchen Untersuchungen zu berücksichtigen. Das wichtigste Beispiel dafür sind die in Abschnitt VI beschriebenen Experimente, in denen die Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung vom Stroma-pH geschildert wurde (siehe auch Kapitel VII c). Die zu diesem Zweck ausgearbeiteten Techniken zur gezielten Variation des Stroma-pH (Abschnitt IV d) können auch auf andere Fragestellungen angewendet werden. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, die pH-Abhängigkeit weiterer Stoffwechselreaktionen im Chloroplastenstroma - z.B. der Enzyme des Calvinzyklus - in vivo zu untersuchen.

Da es die Hauptaufgabe des Chloroplasten ist, die Pflanzenzelle mit Produkten der CO_2 -Fixierung zu versorgen, sind die Transportvorgänge an der Innenmembran eng mit der Funktion dieser Organelle verknüpft. Eine zentrale Bedeutung nimmt in diesem Zusammenhang der Phosphatcarrier ein, da über ihn ein Großteil der Photosyntheseprodukte aus dem Chloroplasten in das Cytoplasma ausgeschleust wird. Die Untersuchungen, die sich mit dem Einfluß des pH-Gradienten über die Innenmembran auf diesen Carrier beschäftigen, stehen erst am Anfang (Abschnitt V a). Aber schon jetzt läßt sich eindeutig zeigen, daß die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromaraumes den Transport von Substanzen, die über den Phosphat-Translokator laufen, in charakteristischer Weise beeinflusst (Abschnitt V a, VII b), wie auch weiterführende Untersuchungen von Heldt et al. (unveröffentlicht) ergeben haben. Die Aufnahme und Verteilung von DMO und Methylamin im Chloroplasten erfolgt nach der pH-abhängigen An- bzw. Abreicherung von schwachen Säuren bzw. Basen. Dies bildet die Voraussetzung für die pH-Bestimmung mit diesen Substanzen (Abschnitt III). Für die Aufnahme von Kohlendioxid konnte der gleiche Mechanismus aufgezeigt werden (Abschnitt Vc, VII b). Das führt zu einer lichtabhängigen Anreicherung von Bikarbonat im Chloroplastenstroma, dessen physiologische Bedeutung in Abschnitt VII b diskutiert wird. Es ist zu erwarten, daß auch die Verteilung von anderen schwachen Säuren nach demselben Prinzip erfolgt, falls sie nur in der ungeladenen Form die Innenmembran passieren können und der Transport nicht über einen spezifischen Translokator läuft. Dies trifft möglicherweise für die Glykolsäure zu, deren Bedeutung im Stoffwechsel der Pflanzenzelle von Walker (i. Dn.) diskutiert wird. Die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromaraumes würde damit auch die Verteilung und die Metabolitflüsse dieser Substanzklasse zwischen Chloroplast und Cytoplasma auf charakteristische, vorhersagbare Art verändern. Die aufgeführten Beispiele zeigen, daß die lichtabhängige Änderung des pH-Gradienten über die Innenmembran den Austausch von Substanzen zwischen Chloroplast und Cytoplasma auf vielfältige Weise beeinflusst. Durch die Ausarbeitung von Methoden zur gezielten Beeinflussung dieses pH-Gradienten (Tabelle 9) sind die Vor-

aussetzungen für eingehendere Untersuchungen auf diesem Gebiet gegeben.

Ein wichtiges Arbeitsgebiet der Photosyntheseforschung ist die Aufklärung der Photophosphorylierung, vor allem die Frage, inwieweit Membranpotentiale und pH-Gradient über die Thylakoidmembran im Zusammenhang mit der ATP-Synthese stehen. Fragen dieser Art lassen sich sicher besser mit isolierten Thylakoiden als mit intakten Chloroplasten untersuchen, vor allem deswegen, weil die Permeabilität der Innenmembran für Adeninnukleotide relativ gering ist (Heldt, 1969). Trotzdem ist es wichtig zu wissen, daß auch in intakten Chloroplasten ein pH-Gradient in derselben Größe zu finden ist, wie er in "gebrochenen Chloroplasten" gemessen wird. Auffallend bei unseren eigenen Untersuchungen war die Tatsache, daß der pH-Gradient über die Thylakoidmembran durch Zugabe des Entkopplers Methylamin in beträchtlichem Maße reduziert werden konnte, ohne die CO_2 -Fixierung und die Phosphoglyzeratreduktion zu hemmen (Abb. 33). Das würde bedeuten, daß der Schwellenwert des pH-Gradienten, der zur Photophosphorylierung notwendig ist, relativ niedrig liegt, möglicherweise niedriger als in "gebrochenen Chloroplasten" (Pick et al., 1974). Allerdings besteht die Möglichkeit, daß die Größe des Thylakoidraumes bei der pH-Berechnung zu hoch angesetzt ist (vgl. Abschnitt III d). In diesem Fall wäre das pH im Thylakoidraum niedriger und der pH-Gradient über die Thylakoidmembran in Wirklichkeit höher als angegeben. Wie die Werte der Tabelle 3 vermuten lassen, dürfte dieser Fehler jedoch kaum mehr als 0.3 pH-Einheiten betragen.

Die lichtabhängige Alkalisierung des Stroma-pH spricht für eine relativ geringe Permeabilität der Innenmembran für Protonen. Damit jedoch nur schwer vereinbar ist die Tatsache, daß das Stroma-pH eine deutliche Abhängigkeit vom vorgegebenen pH des Mediums besitzt. Auch liegt das Stroma-pH im Dunkeln unter dem des Mediums. Es kann durch Zugabe von CCCP oder Nigericin auch nicht an das pH des Mediums angeglichen werden, obwohl diese Substanzen die Protonenpermeabilität erhöhen. Dies spricht dafür, daß der pH-Gradient im Dunkeln durch eine Donnan-Verteilung zustande kommt und die Innenmembran für Protonen nicht völlig impermeabel ist. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß diese

Durchlässigkeit der Innenmembran auf eine präparationsbedingte Schädigung zurückzuführen ist. Dafür sprechen möglicherweise die pH-Bestimmungen in der Blaualge *Anacystis nidulans*. Auch hier findet man eine lichtinduzierte Alkalisierung des Cytoplasma (Falkner et al., 1974), das intrazelluläre pH ist jedoch unabhängig vom pH des Mediums. Im Gegensatz zu den Chloroplasten, die erst aus Blättern isoliert werden müssen, können diese Algen ohne weitere Isolations-schritte für das Experiment verwendet werden, so daß mit einer präparationsbedingten Membranschädigung in diesem Fall nicht zu rechnen ist.

b) Einfluß des pH-Gradienten über die Innenmembran auf den Metabolittransport

Der pH-Gradient über die Innenmembran ($\text{pH}_{\text{Stroma}} - \text{pH}_{\text{Medium}}$) beträgt bei einem Medium-pH von 7.6 im Licht etwa + 0.4 pH-Einheiten, im Dunkeln etwa -0.4. Sowohl der Phosphattranslokator als auch die Aufnahme von Kohlendioxid/Bikarbonat werden dadurch wesentlich beeinflusst.

1.) Bedeutung des pH-Gradienten über die Innenmembran für die Transporteigenschaften des Phosphatcarriers

Die Bilanzgleichung der CO_2 -Fixierung in isolierten Chloroplasten kann vereinfacht folgendermaßen beschrieben werden:



Phosphoglyzerat und Dihydroxyazetonphosphat werden aus dem Chloroplasten ausgeschleust und erscheinen im Medium (Bassham et al., 1968). Der Transport läuft über den Phosphatcarrier, der energieunabhängig im Gegentauch anorganisches Phosphat, 3-Phosphoglyzerat und Dihydroxyazetonphosphat befördert. Dem gleichen Translokator wird auch die Fähigkeit zugeschrieben, indirekt ATP und Reduktionsäquivalente aus dem Chloroplasten ins Cytoplasma zu transportieren (Heldt et al., 1971; vgl. auch Abb. 16):

Im Stroma wird während der Photosynthese- unter Verbrauch von ATP und NADPH- 3-Phosphoglyzerinsäure in Dihydroxyazetonphosphat umgewandelt, das anschließend über den Phosphatcarrier ins Cytoplasma geschafft wird. Dort wird es zu 3-Phosphoglyzerat oxidiert, wobei ATP und NADH gebildet wird. 3-Phosphoglyzerat wird anschließend wieder im Gegentauch mit Dihydroxyazetonphosphat ins Stroma befördert, und der Zyklus beginnt von neuem.

Wahrscheinlich stellt dieser Mechanismus die einzige Möglichkeit dar, das während der Photophosphorylierung erzeugte ATP in größerem Umfang ins Cytoplasma zu schaffen, da der Adeninnukleotidcarrier nur eine geringe Aktivität besitzt (Heldt, 1969).

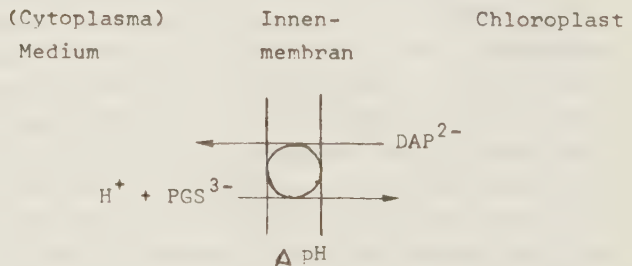
Der indirekte ATP-Transport beinhaltet jedoch folgende Problematik: Auf welche Weise ist der Phosphatcarrier in der Lage, in der einen Richtung (aus dem Chloroplasten in das Cytoplasma) vor allem Dihydroxyazetonphosphat, in der entgegen-

gesetzten Richtung (aus dem Cytoplasma in den Chloroplasten) vor allem Phosphoglyzerat zu befördern?

Von Fliege und Heldt (unveröffentlicht) konnte gezeigt werden, daß die Affinität des Phosphattranslokators für DAP und PGS auf beiden Seiten der Innenmembran gleich groß ist, so daß die postulierte Asymmetrie des Transports nicht auf den Phosphatcarrier selbst zurückzuführen ist.

Natürlich spielen bei diesem Prozess verschiedene Parameter (z.B. Konzentration von DAP und PGS im Stroma und Cytoplasma, Aktivität und Substrataffinität der beteiligten Enzyme) eine wichtige Rolle, die in dieser Arbeit jedoch nicht berücksichtigt wurden.

Bei den Untersuchungen zur Charakterisierung des Phosphatcarriers (Abschnitt V a) konnte die Rate der Phosphoglyzerataufnahme sowohl durch Belichtung als auch durch Erniedrigung des Medium-pH gesteigert werden. Diese Befunde wurden bereits in Abschnitt V a ausführlich diskutiert. Die Abhängigkeit des PGS-Transportes vom pH-Gradienten über die Innenmembran resultiert aus der zusätzlichen negativen Ladung, die dieses Molekül - im Vergleich mit Phosphat oder Dihydroxyazetonphosphat- besitzt. Der "Nettoaustausch via Phosphatcarrier" beim indirekten ATP-Transport kann somit folgendermaßen beschrieben werden:



Auf diese Weise wird auch die Rolle des pH-Gradienten über die Innenmembran bei dieser indirekten Energieübertragung ersichtlich. Die lichtinduzierte Alkalisierung des Stroma-raumes führt zu einer Erhöhung des pH-Gradienten ($\text{pH}_{\text{Stroma}} - \text{pH}_{\text{Medium}}$) und damit zu einer gesteigerten Aufnahme

von PGS aus dem Cytoplasma in den Chloroplasten. Da gleichzeitig der pH-Gradient in umgekehrter Richtung ($pH_{\text{Medium}} - pH_{\text{Stroma}}$) abnimmt, wird die Abgabe von Phosphoglyzerat an das Cytoplasma im Licht gehemmt. Dies wurde inzwischen auch von Fliege und Heldt (unveröffentlicht) experimentell bestätigt.

Die gleichen Überlegungen lassen sich auch für den Transport von Dihydroxyazetonphosphat anstellen. Bei einem Gegen-tausch von Dihydroxyazetonphosphat mit Phosphoglyzerat begünstigt der im Licht aufgebaute pH-Gradient über die Innenmembran die Aufnahme von Phosphoglyzerat in den Chloroplasten und die Abgabe von Dihydroxyazetonphosphat an das Cytoplasma (Medium). Er schafft damit die Voraussetzung für den indirekten ATP-Transport.

2.) Einfluß des pH-Gradienten über die Innenmembran auf die Aufnahme von Kohlendioxid in das Chloroplastenstroma

Der Mechanismus der Aufnahme von Kohlendioxid in den Chloroplasten war lange Zeit Gegenstand zahlreicher Spekulationen. Die niedrige Affinität der isolierten Ribulosediphosphat - Carboxylase für CO_2 schien nämlich eine aktive Anreicherung von Kohlendioxid in den Chloroplasten notwendig zu machen.

Die Ribulosediphosphat-Carboxylase katalysiert die Umwandlung von Ribulosediphosphat und Kohlendioxid in zwei Moleküle Phosphoglyzerat. Diese Reaktion stellt damit den ersten Schritt der CO_2 -Fixierung dar. Der Anteil von Kohlendioxid in der Atmosphäre beträgt etwa 0.033% . Die "Durchschnittspflanze" ist unter diesen Verhältnissen in der Lage, im Licht etwa 100 $\mu\text{mole Kohlenstoff/mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ zu fixieren. Im Gegensatz dazu besaßen die ersten Enzym-Präparationen der Ribulosediphosphat-Carboxylase bei der gleichen CO_2 -Konzentration nur 1/500 dieser Aktivität, bedingt durch die hohe Michaeliskonstante, die einer Konzentration von 6% CO_2 in der Atmosphäre entsprochen hätte (zitiert nach Walker, i. Dr.).

Um diese Diskrepanz zu beseitigen, wurde ein aktiver Transport von CO_2 oder Bikarbonat postuliert, der zu einer Anreicherung von CO_2 bzw. Bikarbonat im Chloroplastenstroma führen sollte (Gibbs, 1967; Miginiac-Maslow und Champigny, 1971).

Auch eine Anreicherung von Bikarbonat auf Grund des pH-Gradienten über die Innenmembran wurde diskutiert (Everson, 1969).

Inzwischen konnte jedoch von Lilley und Walker (i. Dr.) gezeigt werden, daß die isolierte Ribulosediphosphat-Carboxylase auch bei physiologischen CO_2 -Konzentrationen dieselbe Aktivität besitzt, wie sie für die CO_2 -Fixierung in isolierten Chloroplasten gemessen werden kann. Obwohl dies natürlich keinen Beweis gegen das Vorhandensein eines aktiven Transports von CO_2 /Bikarbonat darstellt, so entfällt dadurch zumindest seine Notwendigkeit.

Unsere eigenen Untersuchungen über den Aufnahmemechanismus von CO_2 /Bikarbonat sind im Abschnitt V c dieser Arbeit zusammengefaßt. Sie führten zu folgenden Schlußfolgerungen:

α) Die Aufnahme von CO_2 /Bikarbonat in die Chloroplasten erfolgt über eine Diffusion von Kohlendioxid durch die Innenmembran. Es gibt keinen Hinweis für einen spezifischen Transport von Bikarbonat, wie er von Poincelot (1974) in seinen Experimenten gefunden wurde.

β) Im Stroma stellt sich anschließend ein Gleichgewicht zwischen CO_2 und Bikarbonat ein, wobei die CO_2 -Konzentration pH-unabhängig und genauso groß wie im Medium ist. Die Verteilung des Bikarbonats in beiden Kompartimenten ist abhängig vom pH-Gradienten über die Innenmembran. Der Anreicherungsfaktor im Stroma nimmt mit steigender pH-Gradienten $(\text{pH}_{\text{Stroma}} - \text{pH}_{\text{Medium}})$ zu (vgl. Abschnitt V c3).

Die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromaraumes führt damit tatsächlich zu einer Anreicherung von Bikarbonat, wie von Everson bereits vermutet wurde. Da jedoch CO_2 und nicht Bikarbonat das Substrat der Ribulosediphosphat-Carboxylase darstellt (Cooper et al., 1969), ist die physiologische Bedeutung dieses Vorganges unklar. Das akkumulierte Bikarbonat könnte zwar als CO_2 -Reserve dienen, da es durch die Carboanhydrase schnell in Kohlendioxid rückverwandelt werden kann. Dieser Vorrat würde jedoch bei maximaler Aktivität der CO_2 -Fixierung schon nach wenigen Sekunden verbraucht sein.

c) Regulation der CO₂-Fixierung

Mit intakten Chloroplasten wurde eine optimale CO₂-Fixierung bei einem Medium-pH von etwa 7.6 gefunden (Walker, persönliche Mitteilung; Reeves, 1972; Avron u. Gibbs, 1974). Ähnliche Werte ergaben sich auch bei unseren Experimenten (pH 7.6-7.8). Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur pH-Bestimmung in Chloroplasten ermöglicht es nun, die CO₂-Fixierungsrate direkt in Abhängigkeit vom Stroma-pH zu messen. Dabei verschiebt sich das pH-Optimum zu höheren Werten (pH 7.9-8.3). Berücksichtigt man die Tatsache, daß die pH-Optima von Enzymen in verdünnten wässrigen Lösungen nicht unbedingt genau die gleichen sind wie in dem dicht gepackten Proteingel des Stromaraumes, so besteht eine gute Übereinstimmung des für eine maximale CO₂-Fixierung notwendigen Stroma-pH mit den pH-Optima einiger wichtiger Chloroplastenenzyme: Fruktosediphosphatase pH 8.5-8.8 (Racker u. Schroeder, 1958; Preiss et al., 1967; von Garnier u. Latzko, 1972), Phosphoribulokinase pH 7.9 (Hurwitz et al., 1966), NADP-Glyzerinaldehydphosphat - Dehydrogenase pH 8.0 (von Garnier, 1972), α -1-4 Glykosyltransferase pH 8.5 (Ghosh u. Preiss, 1965), Ribulosediphosphat-Carboxylase pH 8.3 (Bahr u. Jensen, 1974) und zyklische Photophosphorylierung pH 8.8 (Winget et al., 1965).

Alle genannten Enzyme benötigen zur maximalen Aktivität ein relativ alkalisches pH, wie es nur im Stroma von belichteten, jedoch nicht von unbelichteten Chloroplasten zu finden ist. Um die Abhängigkeit der CO₂-Fixierung vom pH im Stromaraum genauer untersuchen zu können, wurden verschiedene Methoden ausgearbeitet, die es erlauben, das pH in diesem Kompartiment gezielt zu variieren (vgl. Abschnitt IV d). Alle in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente führten zu dem Ergebnis, daß die CO₂-Fixierung ihr Optimum bei einem Stroma-pH von 7.9-8.3 besitzt und durch Erniedrigung des pH auf ungefähr 7.2 vollständig gehemmt werden kann (Abschnitt VI a). Völlig anders dagegen verhält sich die Phosphoglyzeratreduktion, die einen Teilschritt der CO₂-Fixierung darstellt. Sie ist in dem untersuchten Bereich (pH 7.0-8.6) nahezu unabhängig vom Stroma-pH (Abb. 29). Die Reduktion des Phosphoglyzerats zu Dihydroxyazetonphosphat benötigt ATP und NADPH in etwa dem gleichen Verhältnis wie die Gesamtreaktion. Die Hemmung der CO₂-Fixierung läßt sich

folglich nicht auf ein vermindertes Angebot von ATP und NADPH zurückführen, so daß von einer echten Regulation des Calvin-Zyklus durch das Stroma-pH gesprochen werden kann. Dies wird auch durch die Experimente der Abb. 32 und 33 zum Ausdruck gebracht. Dabei wurde durch Zugabe steigender Mengen der Entkoppler CCCP bzw. Methylamin der pH-Gradient über die Thylakoidmembran, der als treibende Kraft der Photophosphorylierung angesehen wird, sukzessive erniedrigt. Sinkt dieser pH-Gradient unter eine gewisse Grenze, so tritt auf Grund des verminderten Angebots an ATP eine Hemmung der CO_2 -Fixierung und Phosphoglyzeratreduktion ein. In dem Experiment mit Methylamin (Abb. 33) läuft die Hemmung der beiden Reaktionen parallel. Bei der Entkopplung mit CCCP (Abb. 32) ist die CO_2 -Fixierung schon bei einer CCCP-Konzentration von $1\text{ }\mu\text{M}$ vollständig gehemmt, obwohl der pH-Gradient noch so hoch ist, daß die Phosphoglyzeratreduktion nur geringgradig abfällt. Während das Stroma-pH durch Methylamin nicht beeinflußt wird, sinkt es bereits bei niedrigen CCCP-Konzentrationen ($0.5\text{--}1\text{ }\mu\text{M}$) auf den Dunkelwert ab, so daß auch in diesem Experiment die Hemmung der CO_2 -Fixierung auf die Erniedrigung des Stroma-pH zurückgeführt werden kann.

Welche physiologische Bedeutung könnte diese Regulation der CO_2 -Fixierung durch das Stroma-pH besitzen? Das für die CO_2 -Fixierung benötigte ATP und NADPH wird normalerweise unter Ausnutzung von Lichtenergie in der photosynthetischen Elektronentransportkette gebildet. Prinzipiell sollte jedoch der Calvin-Zyklus auch im Dunkeln ablaufen können, wenn auf andere Weise Energie und Reduktionsäquivalente bereitgestellt würden.

Unser Modellsystem der CO_2 -Fixierung im Dunkeln zeigt, daß mit dieser Möglichkeit durchaus gerechnet werden muß. Die dabei gefundenen Resultate (PGS als Produkt der Dunkelfixierung, $\text{K}_{\text{MCO}_2} \sim 6\text{ }\mu\text{M}$, Spezifität für DAP und Oxalazetat, Stimulierung durch DTT) deuten darauf hin, daß es sich dabei um die gleichen enzymatischen Reaktionen wie bei der CO_2 -Fixierung im Licht- und nicht um einen Artefakt handelt.

Eine ähnliche Situation ist auch in der intakten Pflanzenzelle vorstellbar: Die während der Photosynthese gebildeten Produkte werden zum überwiegenden Teil ins Cytoplasma transportiert

(Phosphoglyzerinsäure, Dihydroxyazetonphosphat und weitere Folgeprodukte) und dort weiter metabolisiert. Über den oxidativen und glykolytischen Stoffwechsel könnte im Dunkeln durch Abbau dieser Verbindungen ATP und NADH gebildet werden, das anschließend wieder in den Chloroplasten transportiert wird. Obwohl die Innenmembran für Nikotinadeninnukleotide impermeabel ist und auch der Adeninnukleotidcarrier nur eine sehr geringe Transportkapazität besitzt (Helldt, 1969), ist ein indirekter Transport von NAD(P)H und ATP via Phosphat- und Dicarboxylatcarrier in beträchtlichem Ausmaß möglich (Zusammenfassung siehe Heber, 1974). Auch die hier beschriebene Dunkelfixierung beweist das Funktionieren dieses indirekten Transportes von Energie und Reduktionsäquivalenten. Damit sind die Voraussetzungen für das Ablaufen der CO_2 -Fixierung im Dunkeln gegeben.

Diese Reaktion würde für die Pflanzenzelle einen äußerst unökonomischen Vorgang darstellen, da sie zum Abbau eines Teils der während der Photosynthese gebildeten Verbindungen führen würde. Da das Gleichgewicht praktisch vollständig auf der Seite des Abbaus liegt (vgl. Abb. 36), könnte so ein nichtunerheblicher Teil der im Licht produzierten Substanzen im Dunkeln wieder verbraucht werden:

Eine Dunkel- CO_2 -Fixierung kann jedoch in der intakten Pflanzenzelle nicht beobachtet werden. Daraus muß gefolgert werden, daß der Chloroplast einen Regulationsmechanismus besitzt, der in der Lage ist, den Calvin-Zyklus im Licht ein- und im Dunkeln wieder abzuschalten. In diesem Zusammenhang sind die von Pedersen et al., (1966) durchgeführten Versuche sehr aufschlußreich. Durch Messungen der Substratspiegel in der Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* beim Licht-Dunkel-Übergang kamen diese Autoren zu folgenden Schlußfolgerungen:

1.) Die Intermediate des photosynthetischen Calvin-Zyklus stehen mit den Intermediaten der Glykolyse im Gleichgewicht.

Dies zeigt, daß der cytoplasmatische Raum und der Chloroplast keine in sich abgeschlossenen Kompartimente darstellen. Änderungen der Metabolit Spiegel in dem einen Raum spiegeln sich in Änderungen der Metabolitkonzentrationen im anderen Kompartiment wieder. Dies unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit der Regulation der CO_2 -Fixierung.

2.) Die Fruktosediphosphatase, die Fruktose-1.6-diphosphat in Fruktose-6-phosphat umwandelt, wird im Licht aktiviert und liegt im Dunkeln in einer inaktiven Form vor.

3.) Auch die Ribulosediphosphat-Carboxylase besitzt im Licht eine höhere Aktivität als im Dunkeln.

Dieselben Befunde wurden auch mit isolierten Chloroplasten erhalten (Bassham et al., 1968; Jensen und Bassham, 1968). Als drittes lichtaktivierbares Enzym wird von Bassham und Krause (1969) die Phosphoribulokinase diskutiert.

Auf welche Weise kommt diese Aktivierung bzw. Inaktivierung zustande? Beim Dunkel-Licht-Übergang werden im Chloroplastenstroma einige Parameter verändert, die gleichzeitig die Aktivität der genannten Enzyme beeinflussen. Damit wären sie geeignet, bei der Regulation der CO_2 -Fixierung mitzuwirken:

1.) Beim Dunkel-Licht-Übergang wird die Magnesiumkonzentration im Stroma durch Transport von Magnesium über die Innen- und Thylakoidmembran heraufgesetzt und dadurch die Aktivität dieser Enzyme erhöht (Jensen 1971; Bassham 1971; Walker 1972).

2.) Änderungen des Redoxgrades der photosynthetischen Elektronentransportkette bei Belichtung beeinflussen ebenfalls die Aktivität der oben genannten Enzyme, möglicherweise durch Reduktion von Disulfidbindungen zu SH-Gruppen (Gibbs et al. 1968; Müller et al., 1969; Wildner und Criddle, 1969; Buchanan et al., 1971; Bassham, 1971; Anderson und Lim, 1972).

3.) Von Jensen und Bassham (1968) wurde erstmals eine mögliche Regulation des Calvin-Zyklus durch die lichtinduzierte Alkalisierung des Stromaraumes diskutiert, da die Aktivität der Fruktosediphosphatase und Ribulosediphosphat-Carboxylase eine starke pH-Abhängigkeit zeigen.

Diese Hypothese wird durch unsere Ergebnisse experimentell gesichert. Sowohl die Rate der CO_2 -Fixierung im Licht (Abschnitt VIa) als auch im Dunkeln (Abschnitt VI b) kann auf Werte unter 10% gesenkt werden, wenn das Stroma-pH von 8.0 auf etwa 7.2 erniedrigt wird. Die Tatsache, daß beim Licht-Dunkel-Übergang pH-Veränderungen dieses Ausmaßes im Chloroplastenstroma auch gefunden werden (vgl. Abschnitt IV), spricht für die physiologische Bedeutung dieses Regulationsmechanismus.

Die Experimente, in denen in belichteten Chloroplasten das Stroma-pH artefiziell ohne Variation weiterer Parameter (z.B. pH-Gradient über die Thylakoidmembran, Lichtintensität, Magnesiumkonzentration) erniedrigt wurde, weisen darauf hin, daß diese pH-Veränderungen allein ausreichend sind, um die CO_2 -Fixierung zu regulieren. Damit soll jedoch nicht gesagt werden, daß die Regulation des Calvin-Zyklus in der intakten Pflanzenzelle ausschließlich über das Stroma-pH erfolgt. Das Experiment der Abb. 39 ist ein Hinweis dafür, daß diese Steuerung durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren erfolgt: Die Rate der Dunkel- CO_2 -Fixierung kann durch Zugabe des SH-Donators Dithiothreitol um etwa das Fünffache gesteigert werden, wobei man die Wirkung dieser Substanz auf die Aktivierung von Enzymen zurückführt, die SH-Gruppen benötigen. Wie auf Seite 104 diskutiert wurde, kann dieser Effekt beim Licht-Dunkel-Übergang in Chloroplasten durch Änderung des Redoxgrades der photosynthetischen Elektronentransportkette hervorgerufen werden. Somit ist auch auf diese Weise eine erhebliche Reduzierung der CO_2 -Fixierung im Dunkeln zu erreichen. Aber auch in Gegenwart von Dithiothreitol wird der Calvin-Zyklus nahezu vollständig blockiert, wenn das Stroma-pH unter einen Wert von 7.0 erniedrigt wird.

Eine Schlüsselstellung bei der Regulation der CO_2 -Fixierung durch das Stroma-pH nimmt möglicherweise die Fruktosediphosphatase ein, die wahrscheinlich das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Calvin-Zyklus darstellt (Pedersen et al., 1966; Bassham und Krause, 1969) und eine sehr starke pH-Abhängigkeit besitzt (Abb. 40). Durch Erhöhung des pH um etwa eine Einheit kann die Aktivität von 0% auf 100% gesteigert werden, wobei die Anfangs- und Endpunkte dieses pH-Bereichs wiederum von der Magnesiumkonzentration und von der Zugabe von Ferredoxin oder Dithiothreitol abhängig sind (Buchanan et al., 1971; von Garnier und Latzko, 1972). Bei hohen Magnesiumkonzentrationen (10mM) wird zur maximalen Aktivität der Fruktosediphosphatase ein pH benötigt, wie es im Stroma von belichteten Chloroplasten gemessen werden kann, während das pH, bei dem das Enzym völlig gehemmt ist, etwa dem Dunkelwert des Stroma-pH entspricht (Abb. 40).

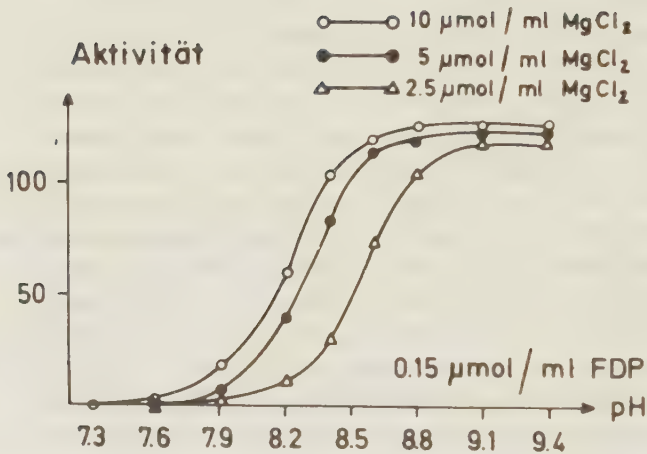


ABBILDUNG 40

pH-ABHÄNGIGKEIT DER FRUKTOSEDIPHOSPHATASE AUS SPINATBLÄTTERN
BEI VERSCHIEDENER MAGNESIUMKONZENTRATION

aus: R.v.Garnier und E. Latzko: Regulation of photosynthetic
C-1-Fructose-Diphosphatase

in "Proceedings of the 2nd International Congress on Photo-
synthesis Research", Stresa 1971, Vol. III p. 1839 (Dr. W. Junk
Publishers The Hague 1972).

Somit besteht eine gute Übereinstimmung der pH-Abhängigkeit
der Fruktosediphosphatase (Abb. 40), der pH-Abhängigkeit
der CO_2 -Fixierung im Licht (Abb. 29) und im Dunkeln (Abb. 39)
und der pH-Veränderungen, wie sie beim Licht-Dunkel-Übergang
im Chloroplastenstroma gemessen werden können (Abschnitt IV).

Kürzlich wurde von Bahr und Jensen (1974) eine ähnlich. starke pH-Abhängigkeit der Ribulosediphosphat-Carboxylase beschrieben, so daß auch dieses Enzym vom pH im Stromaraum reguliert werden könnte.

Die lichtinduzierte Alkalisierung des Chloroplastenstroma ist damit mehr als nur eine notwendige Folge der Ausbildung des pH-Gradienten über die Thylakoidmembran. Über die Steuerung der Aktivität der Fruktose-diphosphatase und Ribulosediphosphat-Carboxylase ist sie entscheidend an der Regulation der CO_2 -Fixierung beteiligt.

VIII ZUSAMMENFASSUNG

- 1.) Aufbauend auf dem Prinzip der pH-abhängigen Verteilung schwacher Säuren und Basen wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, das pH im Stroma- und Thylakoidraum isolierter Spinatchloroplasten gleichzeitig zu bestimmen.
- 2.) Der lichtinduzierte Protonentransport über die Thylakoidmembran führt zu einer Alkalisierung des Stromaraumes um 0.7 - 1.0 pH-Einheiten, zu einer Erniedrigung des pH im Thylakoidraum und zur Ausbildung von pH-Gradienten über die Thylakoid- und Innenmembran. Es werden Möglichkeiten aufgeführt, den pH-Gradienten über die Thylakoidmembran und das Stroma-pH gezielt zu variieren und die Pufferkapazitäten im Stroma- und Thylakoidraum abzuschätzen.
- 3.) Der kürzlich von Heldt und Rapley (1970) beschriebene Phosphat-carrier wird näher charakterisiert. Er kann durch SH-Reagentien (Chloromercuriphenylsulfonsäure) gehemmt werden. Die Transporteigenschaften des Carriers sind abhängig von dem im Licht und Dunkel verschiedenen pH-Gradienten über die Innenmembran.
- 4.) Die Aufnahme von Aminosäuren in Chloroplasten erfolgt via Diffusion über die Innenmembran. Lediglich die Aminosäuren, die über den Dicarboxylatcarrier transportiert werden, machen hiervon eine Ausnahme. Die Aufnahme besitzt eine lineare Abhängigkeit von der vorgegebenen Konzentration und zeigt keinen Unterschied im Licht und im Dunkeln.
- 5.) Die Aufnahme von Kohlendioxid in Chloroplasten erfolgt ebenfalls via Diffusion über die Innenmembran, während diese für Bikarbonat impermeabel ist. Die lichtabhängige Alkalisierung des Stromaraumes führt zu einer Akkumulation von Bikarbonat im Chloroplastenstroma, das über die Carboanhydrase im Gleichgewicht mit Kohlendioxid steht. Die Aufnahme rate von CO_2 in die Chloroplasten kann durch Diamox- einen Carboanhydrasehemmer - vermindert werden.
- 6.) Die CO_2 -Fixierung in isolierten Spinatchloroplasten zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH im Stromaraum. Um eine maximale CO_2 -Fixierungsrate zu erhalten, ist ein Stroma-pH von etwa 8.0 notwendig, während unter pH 7.3 der Calvin-Zyklus nahezu vollständig gehemmt ist.
- 7.) Unter bestimmten Versuchsbedingungen ist es möglich, auch im Dunkeln eine CO_2 -Fixierung - mit Raten über $5 \mu\text{mole/mg Chl.} \cdot \text{h}$ - zu erhalten. Die dafür notwendige Energie wird dabei indirekt in Form von Dihydroxyacetonphosphat zugeführt. Diese Dunkelfixierung zeigt dieselbe Abhängigkeit vom pH im Stromaraum wie die CO_2 -Fixierung im Licht.

8.) Das pH im Stromaraum spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der CO_2 -Fixierung. Erst durch die lichtabhängige Alkalisierung des Stromaraumes wird das für eine maximale Aktivität der CO_2 -Fixierung notwendige pH im Stromaraum eingestellt, während der pH-Abfall im Dunkeln zu einem Abschalten des Calvin-Zyklus führt. Auf diese Weise wird die für die Pflanzenzelle unökonomische CO_2 -Fixierung im Dunkeln verhindert. Die Bedeutung der Fruktosediphosphatase und Ribulosediphosphat-Carboxylase bei dieser Regulation wird diskutiert.

IX ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Butyl-PBD	2-(4-tert. Butylphenyl)-5-(4 Biphenyl)-1,3,4 Oxadiazol
CCCP	m-Chlorcarbonylcyanid-phenylhydrazon
CMS	p-Chloromercuri-phenylsulfonsäure
DAP	Dihydroxyazetonphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
HEPES	N-2-HydroxyäthylpiperazinN'-2-äthansulfonsäure
NADH	Nicotinadenindinucleotid
NADPH	Nicotinadeninnucleotidphosphat
Pa	anorganisches Phosphat
PGS	3-Phosphoglyzerinsäure
TRAP	Triäthanolamin
TRICINE	N-tris-(Hydroxymethyl)methylglyzin

X LITERATURVERZEICHNIS

1. Aach,H.G.; Heber,U.; Z.Pflanzenphysiol. 57 (1967) 317
2. Addanki,S.; Cahill,F.D.; Sotos,J.F.; J.Biol. Chem. 243 (1968) 2337
3. Anderson,L.E.; Lim,T.; FEBS Lett. 27 (1972) 189
4. Avron,M.; Gibbs,M.; Plant Physiol. 53 (1974) 140
5. Bahr,J.T.; Jensen,R.G.; Plant Physiol. 53 (1974) 39
6. Bassham,J.A.; Kirk,M.; Jensen,R.G.; Biochim.Biophys. Acta 153 (1968) 211
7. Bassham,J.A.; Krause,G.H.; Biochim.Biophys. Acta 189 (1969) 207
8. Bassham,J.A.; Science 172 (1971) 526
9. Bergmeyer,H.U.; Methoden der enzymatischen Analyse (1970) Verlag Chemie, Weinheim, 1282, 1379, 1548
10. Blank,M.; Roughton,F.J.W.; Trans. Faraday Soc. 56 (1960) 1832
11. Buchanan,B.B.; Schürmann,P.; Kalberer,P.P.; J.Biol.Chem. 246 (1971) 5952
12. Calvin,M.; Angew. Chemie 74 (1962) 165
13. Cockburn,W.; Walker,D.A.; Baldry,C.W.; Biochem.J. 107 (1968) 89
14. Cooper,T.G.; Filmer,D.; Wishnik,M.; Lane,M.D.; J. Biol. Chem. 244 (1969) 1081
15. Deamer,D.W.; Crofts,A.R.; Packer,L.; Biochim.Biophys.Acta 131 (1967) 81
16. Dilley,R.A.; Park,R.B.; Branton,D.; Photochem. Photobiol. 6 (1967) 407
17. Everson,R.G.; Slack,C.R.; Phytochemistry 7 (1968) 581
18. Everson,R.G.; Nature 222 (1969) 876
19. Everson,R.G.; Phytochemistry 9 (1970) 25
20. Falkner,G.;Werdan,K.;Horner,F.;Heldt,H.W.;Ber. Dt.Bot. Ges., 87(1974) 263
21. Fonyo,A.; Biochem.Biophys.Res. Comm. 32 (1968) 624
22. Gaensslen,R.E.; Mc Carty,R.E.; Arch.Biochem.Biophys. 147 (1971) 55

23. v. Garnier, R.; Dissertation, 1972; Technische Universität München
24. v. Garnier, R.; Latzko, E.; Proc. II. Int. Congress of Photosynthesis Research, Stresa 1971; (Forti, G.; Avron, M.; Melandri, A.; eds.) Vol. 3, 1839; Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague (1972)
25. Ghosh, H.P.; Preiss, J.; Biochem. 4 (1965) 1354
26. Gibbs, M.; Ann. Rev. Biochem. 36 (1967) 757
27. Gibbs, M.; Ellyard, P.W.; Latzko, A.; in Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis (Shibata, K.; Takamiya, A.; Jagendorf, A.T.; Fuller, R.C.; eds) 387; Univ. of Tokyo Press, Tokyo, (1968)
28. Gimmler, H.; Schäfer, G.; Kraminer, H.; Heber, U.; Proc. III Int. Congr. of Photosynth. Res., Rehovot, Israel, 1974, im Druck
29. Hager, A.; Planta 89 (1969) 224
30. Heber, U.; Santarius, K.A.; Z. Naturforsch. 25b (1970) 718
31. Heber, U.; Krause, G.; in Photosynthesis and Photorespiration (Hatch, M.D.; Osmond, C.B.; Slatyer, R.O. eds) 218; Wiley-Interscience, New York, (1971)
32. Heber, U.; Ann. Rev. Plant Phys. 25 (1974) 393
33. Heldt, H.W.; FEBS Lett. 5/1 (1969) 11
34. Heldt, H.W.; Rapley, L.; FEBS Lett. 10 (1970) 143
35. Heldt, H.W.; Sauer, F.; Biochim. Biophys. Acta 234 (1971) 83
36. Heldt, H.W.; Rapley, L.; Sauer, F.; Proc. II. Int. Congr. of Photosynthesis Research, Stresa, 1971 (Forti, G.; Avron, M.; Melandri, A.; eds) Vol. 2, 1345; Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague (1972)
37. Heldt, H.W.; Werdan, K.; Milovancev, M.; Geller, G.; Biochim. Biophys. Acta 314 (1973) 224
38. Heldt, H.W.; Fliege, R.; Lehner, K.; Milovancev, M.; Werdan, K.; Proc. III. Int. Congr. of Photosynthesis Research, Rehovot, Israel, 1974; im Druck
39. Hilgenheger, H.; Menke, W.; Z. Naturforsch. 20b (1965) 699
40. Hurwitz, J.; Weisbach, A.; Horecker, B.L.; Smyrniotis, P.Z.; J. Biol. Chem. 218 (1966) 769
41. Itoh, M.; Izawa, S.; Shibata, K.; Biochim. Biophys. Acta 66 (1963) 319
42. Jensen, R.G.; Bassham, J.A.; Biochim. Biophys. Acta, 153 (1968) 22
43. Jensen, R.G.; Biochim. Biophys. Acta, 234 (1971) 360

44. Klingenberg, M.; Pfaff, E.; *Methods Enzymol.* 10 (1967) 680
45. Kreutz, W.; *Z. Naturforsch.* 25b (1970) 88
46. Leech, R.M. in Godwin, T.W.; *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. 1, London, New York, 65 (1966)
47. Lehner, K.; Heldt, H.W.; *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chemie* 354 (1973) 1217
48. Lilley, R.McC.; Walker, D.A.; *Plant Physiol.*, im Druck
49. Magid, E.; Turbeck, B.O.; *Biochim. Biophys. Acta*, 165 (1968) 515
50. Maren, T.H.; *Physiol. Rev.* 47 (1967) 595
51. Menke, W.; *Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften*, 1972
52. Miginiac-Maslow, M.; Champigny, M.L.; *Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 344
53. Miller, M.M.; Nobel, P.S.; *Plant Physiol.* 49 (1972) 535
54. Müller, M.M.; Ziegler, I.; Ziegler, H.; *Eur. J. Biochem.* 9 (1969),
55. Murakami, S.; Packer, L.; *Plant Physiol.* 45 (1970) 289 101
56. Neumann, J.; Jagendorf, A.T.; *Arch. Biochem. Biophys.* 107 (1964) 109
57. Nobel, P.S.; *Biochim. Biophys. Acta* 172 (1969) 134
58. Nobel, P.S.; Cheung, Y.S.; *Nature New Biology* 237 (1972) 207
59. Pedersen, T.A.; Kirk, M.; Bassham, J.A.; *Biochim. Biophys. Acta*, 112 (1966) 189
60. Pick, V.; Rottenberg, H.; Avron, M.; (1974) *FEBS Lett.* 48, 32-36
61. Poincelot, R.P.; *Biochim. Biophys. Acta* 258 (1972) 637
62. Poincelot, R.P.; *Plant Physiol.* 54 (1974) 520
63. Poole, D.T.; *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 242
64. Preiss, J.; Biggs, M.L.; Greenberg, E.; *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 2292
65. Racker, E.; Schroeder, E.A.R.; *Arch. Biochem. Biophys.* 74 (1958) 326
66. Reeves, S.G.; *Thesis, Universität London* (1972)
67. Reijngoud, D.J.; Tager, J.M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 297 (1973) 174
68. Rottenberg, H.; Grunwald, T.; Avron, M.; *Eur. J. Biochem.* 25 (1972) 54

69. Rumberg, B.; Siggel, U.; *Naturwissenschaften* 56 (1969) 130
70. Schürmann, P.; *J. Chromat.* 39 (1969) 507
71. Sies, H.; Noack, G.; Halder, K.W.; *Eur. J. Biochem.* 38 (1973) 247
72. Sundquist, J.E.; Burris, R.H.; *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 115
73. Tyler, D.D.; *Biochem. J.*; 107 (1968) 121
74. Ullrich, W.; Urbach, W.; Santarius, K.A.; Heber, U.; *Z. Naturforsch.* 20b (1965) 905
75. Urbach, W.; Hudson, M.A.; Ullrich, W.; Santarius, K.A.; Heber, U.; *Z. Naturforsch.* 20b (1965) 890
76. Waddell, W.J.; Butler, T.C.; *J. Clin. Invest.* 38 (1959) 720
77. Walker, D.A.; Hill, R.; *Biochim. Biophys. Acta* 131 (1967) 330
78. Walker, D.A.; Crofts, A.R.; *Ann. Rev. Biochem.* 39 (1970) 389
79. Walker, D.A.; *Proc. II. Int. Congr. of Photosynthesis Research, Stresa, 1971* (Forti, G.; Avron, M.; Melandri, A.; eds) Vol. 3, 1773; Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague (1972)
80. Walker, D.A.; M.T.P. *Int. Rev. Sci., Biochem. Sec.*, (Northcote, D.H., ed.) Vol. II, p. 1, Butterworths, London, im Druck
81. Werdan, K.; Heldt, H.W.; *Proc. II. Int. Congr. of Photosynthesis Research, Stresa, 1971* (Forti, G.; Avron, M.; Melandri, A.; eds) Vol. 2, 1337, Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague (1972)
82. Werdan, K.; Heldt, H.W.; Geller, G.; *Biochim. Biophys. Acta* 283 (1972) 430
83. Werdan, K.; Heldt, H.W.; *Proc. Conf. on Mechanisms in Bioenergetics, Pugnoscio, Italy* 285 Academic Press; London, New York (1973)
84. Whatley, F.R.; Arnon, D.J.; *Methods Enzym.* 6 (1963) 308
85. Wilbur, K.M.; Anderson, N.G.; *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 147
86. Wildner, G.F.; Criddle, R.S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37 (1969) 952
87. Williams, J.A.; Woodbury, D.M.; *J. Physiol.* 212 (1971) 85
88. Winget, G. D.; Izawa, S.; Good, N.E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21 (1965) 438
89. Witt, H.T.; Rumberg, B.; Junge, W.; 19. Colloquium Ges. f. Biol. Chemie, Springer Verlag, Berlin 262 (1968)

Lebenslauf

Ich, Karl Werdan, wurde am 11. Oktober 1947 in Langerringen als Kind des kaufmännischen Angestellten Karl Werdan und seiner Ehefrau Anna, geb. Pecher, geboren. Im Herbst 1954 wurde ich in die Volksschule Schwabmünchen eingeschult. Ab Herbst 1958 besuchte ich das Holbein-Gymnasium in Augsburg, dort bestand ich im Juli 1967 die Reifeprüfung. Im Wintersemester 1967/68 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich auch das Physikum (1970) und das Staatsexamen (Dezember 1973) ablegte. Von Juli 1970 bis Juni 1974 arbeitete ich als Doktorand am Institut für Physikalische Biochemie der Universität München. Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich im Institut für Physikalische Biochemie, in der II. Medizinischen Klinik und in der Chirurgischen Poliklinik der Universität München tätig. Zur Zeit arbeite ich im Institut für experimentelle Radiologie in München-Neuherberg.

Herrn Prof. Dr. M. Klingenberg, Herrn Dr. H. Aquila und Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Sies danke ich für wertvolle Diskussionsbeiträge, Herrn R. Elbers für die Erstellung des Computerprogramms zur pH-Berechnung, meinen Kolleginnen Frau D. Maronde, Frau G. Geller und Frau M. Milovancev für ihre engagierte Mitarbeit.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. H.W. Heldt, danke ich für ideale Arbeitsbedingungen, für sein Interesse an dieser Arbeit; vor allem jedoch dafür, daß er mich gelehrt hat, wissenschaftlich zu denken und zu arbeiten.

